

TESIS DOCTORAL

**PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA
REGENERACIÓN DE LA LESIÓN MUSCULAR:
ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO EN
FUTBOLISTAS**



Javier González Iglesias



eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de Biología Celular e Histología

TESIS DOCTORAL

PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN LA REGENERACIÓN DE LA LESIÓN MUSCULAR:

ENSAYO CLÍNICO ALEATORIZADO EN FUTBOLISTAS

Javier González Iglesias

Leioa, 2022

Directoras:

Isabel Andia Ortiz

Grupo Terapias Regenerativas, IISS Biocruces Bizkaia,
Hospital Universitario Cruces

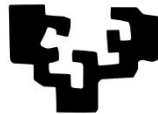
**biocruces
bizkaia**

María Dolores Boyano López

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Biología Celular e Histología

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Fecha de depósito:

Julio del 2022

Trabajo de investigación promovido y apoyado desde los
Servicios Médicos del Athletic Club.



Financiado por la Fundación Athletic Club.



*A mi madre y a mi padre, por su Amor y apoyo
incondicional.*

PREFACIO

Las lesiones musculares disminuyen la calidad de vida y autonomía de las personas, tanto en el ámbito deportivo como en la población en general. En el deporte profesional, su alta incidencia representa una gran disminución del rendimiento de los jugadores y en consecuencia también de sus equipos, con importantes pérdidas económicas asociadas. En la población en general también es habitual sufrir lesiones musculares importante en algún momento, ya que en la mayor parte de las intervenciones quirúrgicas es necesario dañar la musculatura. Esto implica postoperatorios largos y con frecuencia dolorosos, por lo que cualquier mejora en el proceso de reparación y regeneración muscular puede tener una enorme repercusión.

Tuve conocimiento del uso del PRP en patologías del aparato locomotor en el año 2007, en los inicios de mi periodo de formación como médico residente. El Dr. Mikel Sánchez y su equipo, en un centro de traumatología y ortopedia de Vitoria, habían comenzado a investigar sobre el uso de PRP en distintos tejidos a principios de este siglo, y a desarrollar diversas aplicaciones clínicas. Su uso, que había comenzado en el ámbito de la hematología en los años setenta, y en cirugía maxilofacial en los noventa, representaba una terapia novedosa a nivel mundial en el ámbito de la Traumatología y de la Medicina Deportiva. En esos comienzos, también participaron compañeros médicos del Athletic Club, y se aplicó PRP en distintos tipos de lesiones en futbolistas. Pronto empezaron a desarrollarse algunas investigaciones, y se ampliaron las indicaciones de tratamiento muy rápidamente, al ser un producto autólogo con una elevada seguridad de uso.

Me fui formando con las publicaciones científicas que iban apareciendo, y aproveché la oportunidad de estar cerca de referentes internacionales en el área, personas como Isabel Andia y Mikel Sánchez, que acumulaban una gran experiencia investigadora y clínica. Pude aprender los distintos tipos de indicaciones, métodos de preparación y técnicas de aplicación del PRP. En el año 2012, tuve la suerte de poder acudir durante varias semanas al centro pionero en estas técnicas, en Vitoria. Pero en aquella época, el número de publicaciones aún era escaso y los datos sobre su uso no eran concluyentes. No dejaba de sorprenderme cuando algunos de mis compañeros médicos se posicionaban a favor o en contra del uso de PRP con absoluta seguridad en sus palabras, cuando no había argumentos suficientes para ello. Así que opté por la postura que consideraba más adecuada: a favor de la investigación en el campo del Plasma Rico en Plaquetas, para intentar formular las preguntas adecuadas y buscar sus respuestas.

El uso de cualquier terapia novedosa en el ámbito de la salud, puede ser un error buscar resultados beneficiosos claros desde las primeras investigaciones y para distintas patologías, o grandes diferencias al comparar distintos productos. Se deben considerar los múltiples factores que condicionan la regeneración de un determinado tejido y las dificultades para objetivar los resultados. Es frecuente el planteamiento de preguntas del tipo todo o nada: *“el producto*

funciona ¿sí o no?". Esto implica focalizarse en los resultados, en lugar de en el método de aplicación y su evaluación. La ausencia de respuestas positivas en fases iniciales de una terapia, donde difícilmente se emplean los protocolos más adecuados, pueda conducir a desestimarla o criticarla sin criterios suficientes para ello.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, pretendo evaluar el efecto del tratamiento con PRP Puro en lesiones musculares agudas. En la parte de la introducción, se presenta una revisión de las bases biológicas del proceso de la reparación y regeneración muscular, y se analizan las múltiples posibilidades de modularlo mediante el uso de PRP. Se valoran distintos factores fundamentales, como el tipo de PRP, para lo que se debe caracterizar su composición celular antes de infiltrarlo y considerar un protocolo de aplicación. Posteriormente, se presenta un ensayo clínico aleatorizado donde participaron 40 futbolistas federados con lesiones agudas severas en los músculos isquiotibiales. Se analizaron cuatro variables explicativas que pueden condicionar el tiempo de recuperación: el tipo de Lesión, el Producto infiltrado, el Momento de la infiltración y la Edad. También se incluyeron, como factores que pueden influir en la baja deportiva, las interacciones Producto-Momento y Edad-Momento. Fue calculado un modelo predictivo del Tiempo de Recuperación en base a los datos registrados, y posteriormente fueron discutidos los resultados. En base a las conclusiones obtenidas, se plantea finalmente una propuesta de protocolo de uso de PRP Puro en las lesiones musculares agudas.

La Medicina Regenerativa es un campo apasionante, en constante desarrollo y con multitud de aplicaciones en distintos tejidos, pero es difícil objetivar resultados positivos. Han de considerarse los múltiples factores que pueden modificar el proceso de regeneración tisular y se deben analizar los resultados obtenidos.

Esta Tesis es el resultado de muchos años de esfuerzo intentando profundizar en el conocimiento de un área de compleja. Desde la revisión de la ciencia básica, hasta la aplicación de una terapia biológica en jugadores de fútbol, empleando el método científico y grandes dosis de ilusión. Siento satisfacción al poder compartir contigo este trabajo, y espero que sirva para seguir avanzando en la regeneración tisular y en la mejora de la calidad de vida de las personas.

Javier González Iglesias

AGRADECIMIENTOS

A todos y todas los que formamos parte del Athletic Club. Josean Lekue, tu apoyo ha sido esencial, el motor de este proyecto. Paco Angulo y Juanma Santisteban, muchas gracias por compartir vuestra experiencia. Fisioterapeutas, preparadores, técnicos, jugadores y jugadoras... compañeros y amigos/as, vuestras aportaciones han aportado valor a este trabajo.

Para las directoras de Tesis, Isabel Andia y Lola Boyano. Estaré siempre agradecido. Isabel, eres ejemplo y referente. Gracias por compartir tus conocimientos. Lola, gracias por apoyarme en las etapas más duras del camino.

A Mikel Sánchez y a todo su equipo. Por tener siempre las puertas abiertas y compartir inquietudes y conocimientos. Y a todos los que, como vosotros, han abierto camino en la investigación biomédica y en la práctica clínica de la Medicina Regenerativa. A Tidball, Kunze, Grassi, Chellini, Caplan, Abbas... autores/as de artículos y libros que facilitan la comprensión de los procesos biológicos de la regeneración muscular. Gracias a su esfuerzo, se comprenden cada vez mejor los efectos de la aplicación del Plasma Rico en Plaquetas. Todos los autores/as que aparecen en las referencias bibliográficas han contribuido, en mayor o menor medida, a la realización de este trabajo.

A Natalia, Valen, Miguel, Julio, Iñaki y Pedro. Personas fundamentales en este camino, al principio, en la mitad o en la recta final. Vuestra ayuda ha sido un grandísimo apoyo. Mil gracias.

A los futbolistas participantes en el estudio. La Medicina avanza gracias a los voluntarios.

A mis padres y a mi hermano, a Gloria, Aner y Alaia. Porque la Vida es mucho mejor con vuestra compañía.

Para ti, Elena. Por tu apoyo continuo, por saber escuchar y por animarme. Por ser una maravillosa compañera de Vida. Y para nuestros pequeños. Espero que, en un futuro, lean con interés esta tesis y que puedan comprobar que seguimos avanzando.

Gracias a todos, por tanta ayuda.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	23
1.1	EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	25
1.1.1	ESTRUCTURA	25
1.1.2	FUNCIÓN	29
1.1.3	LOS MÚSCULOS ISQUIOTIBIALES	30
1.2	LA LESIÓN MUSCULAR	31
1.2.1	CLASIFICACIONES DE LA LESIÓN MUSCULAR	31
1.2.2	LESIÓN EN LOS ISQUIOTIBIALES	33
1.2.3	PRONÓSTICO	34
1.2.4	TRATAMIENTOS HABITUALES	35
1.3	REGENERACIÓN DE LA LESIÓN MUSCULAR	35
1.3.1	RESPUESTA INFLAMATORIA	37
1.3.2	MIOGÉNESIS	43
1.3.3	ANGIOGÉNESIS	47
1.3.4	NEUROGÉNESIS	47
1.3.5	MATRIZ EXTRACELULAR, CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES Y FIBROBLASTOS.	47
1.4	LAS PLAQUETAS EN LA REGENERACIÓN TISULAR	49
1.4.1	FUNCIONES PLAQUETARIAS	50
1.4.2	GRÁNULOS PLAQUETARIOS: ALMACENAJE Y LIBERACIÓN	51
1.4.3	ADHESIÓN, COAGULACIÓN Y DEFENSA	55
1.4.4	CITOQUINAS	56
1.4.5	FACTORES DE CRECIMIENTO	57
1.5	CLASIFICACIONES DE LOS PRP	61
1.5.1	TERMINOLOGÍA	61
1.5.2	CLASIFICACIONES. CARACTERIZACIÓN DEL PRP	62
1.5.3	OBTENCIÓN DE LOS PRPs	64
1.5.4	COMPOSICIÓN Y ACTIVACIÓN DEL PRP	65
1.5.5	APLICACIÓN DEL PRP OBTENIDO: TOTAL VS PARCIAL.	66
1.6	PRP EN LA REGENERACIÓN TISULAR	67
1.6.1	DEFINICIÓN Y CONCEPTOS GENERALES	67
1.6.2	PRODUCTO: COMPOSICIÓN Y VOLUMEN	68
1.6.3	PROTOCOLO: NÚMERO DE INFILTRACIONES, MOMENTO DE INFILTRACIÓN Y TÉCNICA.	69
1.6.4	TEJIDO LESIONADO	71
1.6.5	EDAD Y LESIONES PREVIAS	71
1.6.6	OTROS FACTORES	71
1.6.7	ACCIONES Y MECANISMOS DE REGULACIÓN	72

1.7	INVESTIGACIONES PREVIAS SOBRE EL USO DE PRP EN EL MÚSCULO	78
1.7.1	ESTUDIOS EN CULTIVOS CELULARES Y EN ANIMALES	78
1.7.2	ESTUDIOS CLÍNICOS EN HUMANOS	79
2	<u>JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y MODELO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN</u>	81
2.1	JUSTIFICACIÓN	83
2.1.1	IMPORTANCIA EN EL ÁMBITO DEL DEPORTE Y DE LA MEDICINA	83
2.1.2	PROYECTO: PLANTEAMIENTO INICIAL Y DESARROLLO	84
2.1.3	BENEFICIOS METODOLÓGICOS	84
2.2	OBJETIVOS	86
2.2.1	OBJETIVO GENERAL	86
2.2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	86
2.3	MARCO TEÓRICO DE INVESTIGACIÓN. HIPÓTESIS PRINCIPAL Y SECUNDARIAS	86
3	<u>PACIENTES Y MÉTODOS</u>	89
3.1	PACIENTES	91
3.2	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	92
3.3	PROCEDIMIENTO	92
3.3.1	PRIMERA PARTE: INFILTRACIONES	93
3.3.2	SEGUNDA PARTE: CONTROL EVOLUTIVO	94
3.4	PRODUCTOS E INSTRUMENTOS EMPLEADOS	96
3.5	ESTRATEGIA DE ANÁLISIS Y TÉCNICAS ESTADÍSTICAS	99
3.5.1	REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE: EL MODELO, ESTIMACIÓN DE SUS PARÁMETROS Y CONTRASTES	99
3.5.2	CÁLCULO Y SELECCIÓN DE MODELOS	101
4	<u>RESULTADOS</u>	105
4.1	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA: VARIABLES Y ESTADÍSTICOS	107
4.1.1	EL PRODUCTO INFILTRADO Y LA LESIÓN	108
4.1.1.1	PRP Puro, homeopatía y baja deportiva.	108
4.1.1.2	Tipo de lesión.	109
4.1.2	EDAD, MOMENTO DE LA INFILTRACIÓN Y TIEMPO DE RECUPERACIÓN	111
4.1.3	INFLUENCIA DE LOS VALORES EXTREMOS EN LA BAJA DEPORTIVA	114
4.1.4	RECIDIVAS	115
4.2	MODELO PREDICTIVO DEL TIEMPO DE RECUPERACIÓN	116
4.2.1	FUENTES DE VARIACIÓN EN LA BAJA DEPORTIVA	116

4.2.2	FORMULACIÓN DEL MODELO	117
4.2.3	PARÁMETROS ESTIMADOS EN EL MODELO DE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE	118
4.2.4	MARCO TEÓRICO FINAL DE LA INVESTIGACIÓN	120
4.2.5	BAJA DEPORTIVA	120
4.2.6	BAJA DEPORTIVA Y LAS VARIABLES INDEPENDIENTES.	121
4.2.6.1	El tipo de Lesión modifica la Baja Deportiva.	121
4.2.6.2	El tipo de Producto.	122
4.2.6.3	Momento de la infiltración.	123
4.2.6.4	La Edad modifica la Baja Deportiva.	123
4.2.7	BAJA DEPORTIVA EXPLICADA POR EL MOMENTO DE INFILTRACIÓN EN RELACIÓN CON EL PRODUCTO Y CON LA EDAD	123
4.2.7.1	Interacción Producto-Momento.	124
4.2.7.2	Interacción Edad-Momento.	128
4.2.8	VALIDACIÓN DEL MODELO	134
4.3	POTENCIA ESTADÍSTICA Y CAPACIDAD PREDICTIVA DEL MODELO	138
4.4	IMPORTANCIA DE CADA FACTOR DEL MODELO EN EL TIEMPO DE RECUPERACIÓN	141
4.5	RESUMEN DE LOS RESULTADOS	142
5	<u>DISCUSIÓN</u>	<u>145</u>
5.1	COMPARATIVA CON OTRAS PUBLICACIONES	147
5.2	BAJA DEPORTIVA Y MOMENTO DE INFILTRACIÓN	152
5.2.1	MOMENTO Y PRODUCTO	152
5.2.2	MOMENTO Y EDAD	157
5.2.3	LIMITACIONES Y FORTALEZAS	161
5.3	PROTOCOLO LEZAMA: TRATAMIENTO DE LA LESION MUSCULAR AGUDA CON PRP	162
6	<u>CONCLUSIONES</u>	<u>167</u>
7	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>171</u>
8	<u>ANEXOS</u>	<u>195</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plaquetas activadas	24
Figura 2 - Sarcómero: unidad funcional de las miofibras.	26
Figura 3 - Tejido conectivo alrededor de los fascículos de miofibras.....	27
Figura 4 - Miofibras y células madre.	28
Figura 5 - Señales moleculares y células sobre las que actúan.	28
Figura 6 - Músculos Isquiotibiales.	30
Figura 7 - Lesión en la aponeurosis conjunta Bíceps Femoral-Semitendinoso.	33
Figura 8 - Fases iniciales de la miogénesis.....	37
Figura 9 - Lesión muscular y espacio intersticial en el músculo esquelético.....	40
Figura 10 - Activación de los macrófagos: clásica vs alternativa.	41
Figura 11 - Regulación de la regeneración muscular por el sistema inmune.	42
Figura 12 - Miogénesis: activación de los principales factores de transcripción.....	44
Figura 13 - Patrón de expresión de las proteínas myomaker y myomixer.	46
Figura 14 - Transferencia de microRNAs en la regulación de la miogénesis.	46
Figura 15 - Criterios mínimos para la identificación de Células Madre Mesenquimales.	48
Figura 16 - Contenido plaquetario.	52
Figura 17 - Densidad de los distintos componentes celulares sanguíneos.	64
Figura 18 - Acciones del PRP en la regeneración muscular.	73
Figura 19 - Mecanismos para la angiogénesis.	76
Figura 20 - Modelo Teórico de Investigación	87
Figura 21 - Protocolo de inclusión de los pacientes en el estudio.	92
Figura 22 - Procedimiento: infiltraciones y control evolutivo de los pacientes.	93

Figura 23 - Tiempo de recuperación y producto aplicado.....	109
Figura 24 - Tiempo de recuperación y tipo de lesión	110
Figura 25 - Distribución de lesiones por grupo.	111
Figura 26- Relación entre la Edad y el Tiempo de Recuperación.	113
Figura 27 - Relación entre el Momento de Infiltración y el Tiempo de Recuperación.	113
Figura 28 - Tiempo de Recuperación (días) y Tipo de Lesión.	115
Figura 29 - Tiempo de Recuperación (días) y Producto aplicado.	115
Figura 30 - Modelo Teórico final de la Investigación.....	120
Figura 31 - Punto singular del Momento según el Modelo, empleando PRP Puro en lesiones de la UMT.	126
Figura 32 - Punto singular del Momento según el Modelo, empleando Homeopatía en lesiones de la UMT.	127
Figura 33 - Coeficiente término-Momento y punto singular de la Edad para el PRP-Puro.	129
Figura 34 - Punto singular de la Edad según el Modelo, empleando PRP Puro en lesiones de la UMT.....	130
Figura 35 - Coeficiente término-Momento y punto singular de la Edad para la Homeopatía.	131
Figura 36 - Punto singular de la Edad según el Modelo, empleando Homeopatía en lesiones de la UMT.	132
Figura 37 - Distribución de los residuos en un gráfico QQ-Plot.....	135
Figura 38 - Distribución de los residuos en un Histograma	136
Figura 39 - Cálculo de la potencia estadística del Modelo	139
Figura 40 - Baja deportiva real frente a la baja deportiva calculada con el Modelo.	140
Figura 41 - Exposición al contenido plaquetario después de la fusión de los mioblastos.....	156

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Liberación y acciones de distintos factores de crecimiento en el laboratorio.	61
Tabla 2 - Principales términos relacionados con los concentrados plaquetarios.....	62
Tabla 3 - Codificación del PRP.	66
Tabla 4 - Regeneración muscular y mecanismos moleculares.	78
Tabla 5 - Composición de los PRPs y resultados en ensayos aleatorizados en humanos.....	80
Tabla 6 - Criterios de alta médica.....	95
Tabla 7 - Descripción del PRP empleado: obtención, composición, aplicación.....	97
Tabla 8 - Sistema de codificación del PRP.	98
Tabla 9 - Modelos lineales obtenidos.....	102
Tabla 10 - Descripción de las variables del estudio.....	107
Tabla 11 - Estadísticos del Tiempo de Recuperación en función del producto infiltrado.	108
Tabla 12 - Estadísticos de Tiempo de Recuperación en función del tipo de lesión.....	110
Tabla 13 - Distribución del tipo de lesión entre grupos.	111
Tabla 14 - Estadísticos descriptivos de la Edad, el Momento y el Tiempo de Recuperación. ..	112
Tabla 15 - Resultado del proceso de selección de Modelos.....	116
Tabla 16 - Parámetros estimados en el Modelo de Regresión Lineal Múltiple.....	119
Tabla 17 - Baja deportiva en un Jugador de 20 años con lesión Miofascial.	133
Tabla 18- Baja deportiva en un Jugador de 30 años con lesión Miofascial.	134
Tabla 19 - Tamaño del efecto de las variables sobre la baja deportiva.....	142
Tabla 20 - Resumen de la valoración de las hipótesis.	144
Tabla 21 - Principales variables que modifican el Tiempo de Recuperación.....	147
Tabla 22 - Bases para evitar la infiltración muy precoz de PRP tras la lesión muscular aguda.	154

Tabla 23 - Bases para el uso de una segunda infiltración.....	156
Tabla 24 - Memoria molecular tras la lesión muscular.	160
Tabla 25 - Criterios de alta médica.....	164
Tabla 26 - Conclusiones.....	170

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP/ATP:	Adenosin Difosfato / Adenosin Trifosfato.
AIC:	Criterio de información de Akaike.
AREG:	Amphiregulin (molécula secretada por LTreg).
ATP:	Adenosín trifosfato.
BF:	Músculo Biceps Femoral.
CS:	Célula Satélite.
CTGF:	Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo.
DAMPs:	Moléculas inflamatorias estériles (Damage Associated Molecular Patterns).
FAPs:	Células Progenitoras Fibro-Adipogénicas.
FGF:	Factor de Crecimiento de Fibroblastos.
Grupo CON:	Grupo Control.
Grupo INV:	Grupo Intervención.
H ₀ y H ₁ :	Hipótesis nula e hipótesis alternativa.
HGF:	Factor de Crecimiento de Hepatocitos.
HRG:	Glicoproteína Rica en Histidina.
IGF-1:	Factor de crecimiento insulínico 1.
IL-10:	Interleuquina 10.
INF- γ :	Interferón gamma (citoquina).
ISCT:	Sociedad Internacional para la Terapia Celular.
L-PRF:	Fibrina Rica en Plaquetas leuco enriquecida.
Lesión UMT:	Lesión de la Unión Miotendinosa.
LTh:	Linfocito T colaborador (helper).
LTreg:	Linfocitos T reguladores.
M1 y M2:	Macrófagos M1-proinflamatorios y M2-antiinflamatorios.
MEC:	Matriz Extracelular.
MEF2:	Factor potenciador de miocitos 2.
MHC:	Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

miRNA:	micro Ácido Ribonucleico.
MPO:	Mieloperoxidasa (enzima oxidativa inflamatoria).
MRF:	Factores reguladores miogénicos.
MSC:	Células Madre Mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells).
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de Plaquetas.
PRP:	Plasma Rico en plaquetas.
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear.
RTP:	Tiempo de Recuperación o "Return To Play".
SM:	Músculo Semimembranoso.
ST:	Músculo Semitendinoso.
TGF- β :	Factor de Crecimiento Transformante beta.
TNF- α :	Factor de Necrosis Tumoral alfa (citoquina).
UMT:	Unión Miotendinosa.
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular.
VWF:	Factor Von Willebrand (pro-coagulante).

1 INTRODUCCIÓN

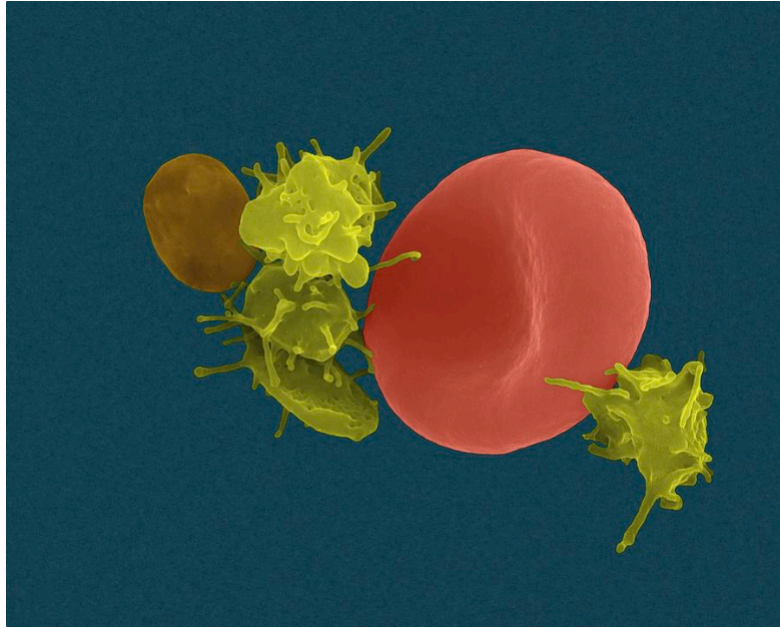


Figura 1 - Plaquetas activadas
Autor: Dennis Kunkel. Fuente: fineartamerica

INTRODUCCIÓN

1.1 EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

1.1.1 Estructura

Existen dos tipos de músculo estriado, el esquelético y el cardíaco. El músculo esquelético es un tejido con enorme actividad y plasticidad, que representa alrededor del 40% del peso total del cuerpo en humanos, y contiene alrededor del 50-75% del total de las proteínas. Se encuentra muy organizado: las fibras musculares se agrupan en haces que son encapsulados por la matriz extracelular, formando fascículos (1).

El músculo esquelético es estimulado por los nervios periféricos de forma voluntaria y consume gran cantidad de energía, presentando fatiga ante esfuerzos mantenidos. Sus principales componentes son:

I. Las miofibras o fibras musculares.

Son células multinucleadas de gran tamaño, muy especializadas en la contracción. Su membrana se denomina sarcolema, y en su interior se encuentran las fibrillas (o miofibrillas), formadas por filamentos contráctiles: miosina (gruesos) y actina (finos). Su disposición establece el patrón característico estriado, con bandas oscuras y claras alternas.

La unidad funcional básica es el **sarcómero**, que representa una estructura compleja compuesta principalmente por los filamentos de las proteínas actina (delgados; rodeados por troponina y tropomiosina) y miosina (gruesos). Visualmente se encuentra delimitado en cada extremo por un disco Z, que se visualiza como una línea estrecha y oscura.

Las fibrillas están conectadas entre sí por medio de proteínas especializadas, los filamentos intermedios, que permiten un acoplamiento mecánico entre ellas, cuya consecuencia es la contracción. Con presencia de calcio se produce la unión de los filamentos: la troponina se activa, y cambia de posición a la tropomiosina, que permite la unión entre los filamentos delgados de actina y las "cabezas" de los filamentos gruesos de miosina. Mediante la hidrólisis de moléculas de adenosín trifosfato (ATP), se produce la liberación de los puentes de unión entre actina y miosina. Por lo tanto, el citoesqueleto de las miofibras es un soporte estructural y mecánico para los ciclos de contracción y relajación (2).

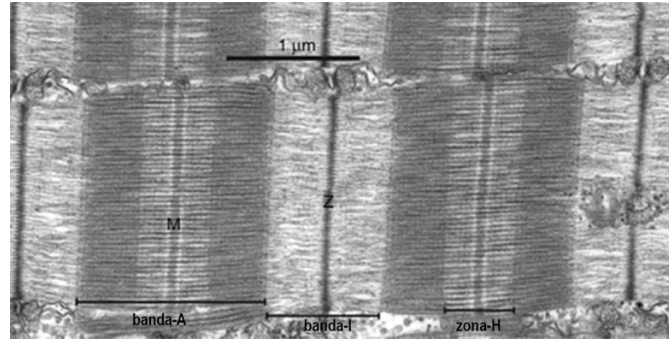


Figura 2 - Sarcómero: unidad funcional de las miofibras.

Microscopía electrónica de una miofibrila, con el eje longitudinal horizontal. Fuente: Sweeney y Hammers, 2018 (2).

Junto a las miofibras, se encuentran las **células satélite**, separadas de la matriz extracelular por la membrana basal. Son células madre que se encuentran en estado quiescente en condiciones normales, y con capacidad de activación, proliferación y diferenciación hacia miofibras cuando se produce una lesión en el músculo.

II. La matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC), también conocida como tejido conjuntivo o tejido conectivo, proporciona protección al músculo, y presenta tres niveles: epimisio (alrededor del músculo), perimisio (rodeando los grupos o fascículos de fibras) y endomisio (alrededor de las fibras). Esta clasificación general ha sido objeto de gran debate, debido al creciente reconocimiento de la complejidad de la estructura y la función de la matriz extracelular (3).

Las principales funciones de la MEC del músculo esquelético son la transmisión de la fuerza y el mantenimiento estructural, junto con la regulación del nicho de las células madre. Para esto último, la MEC interactúa con las células madre directamente mediante la unión a receptores de la superficie celular o indirectamente a través de la presentación de moléculas como los factores de crecimiento, permitiendo el equilibrio entre su quiescencia, auto renovación y diferenciación. Estas interacciones son recíprocas, ya que las células madre pueden remodelar el nicho y secretar o degradar componentes de la MEC (4).

Los componentes principales de la matriz extracelular son **colágenos** (lo más abundante), **glicoproteínas** (laminina, fibronectina) y **proteoglicanos/glicosaminoglicanos** (heparin sulfato, condroitin sulfato) (5). También pueden existir también múltiples proteínas enzimáticas secretadas para el remodelado del colágeno, como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMPs)

Para la producción y el mantenimiento de estas proteínas de matriz es importante la presencia de distintas proteínas de señalización, como los factores de crecimiento (6). Algunos ejemplos son:

- el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF). Regula la expresión del gen del colágeno).
- el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF). Estimula la angiogénesis y regula la proliferación y la acción de los fibroblastos.
- el Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF- β ; isoforma más abundante es TGF- β 1). Es producido por varios tipos celulares, como las células endoteliales, los linfocitos y los macrófagos, y también se encuentra en las plaquetas. Tiene efecto pleiotrópico: múltiples funciones en función del tejido dañado y del microambiente (ver el apartado 1.4.5).

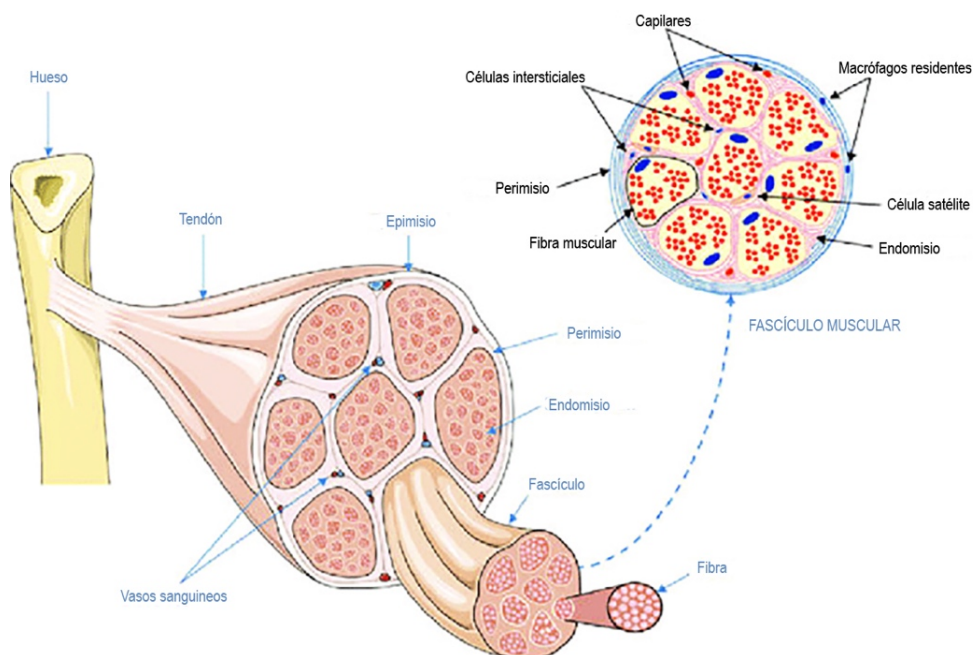


Figura 3 - Tejido conectivo alrededor de los fascículos de miofibras.

Fuente: Sciorati 2016. (7)

Existen múltiples tipos celulares en la MEC, como las **células progenitoras fibroadipogénicas (FAP)**, los **pericitos** y las **células madre mesenquimales (CMM)**. También hay células vasculares endoteliales, células nerviosas (Schwann, perineurales y neuronas), fibroblastos, y células de origen hematopoiético, como los macrófagos, los mastocitos o los linfocitos T reguladores.

III. Las células satélite

Las células satélite son células madre íntimamente asociadas a las miofibras, que se localizan por dentro de la membrana basal. Al producirse una lesión muscular, pasan de un estado quiescente a otro activo. Proliferan, se diferencian y finalmente se fusionan para formar fibras musculares, siendo las principales responsables de la regeneración muscular.

A continuación, es posible ver la imagen de un conjunto de miofibras, junto con células satélite, pericitos y CMM.

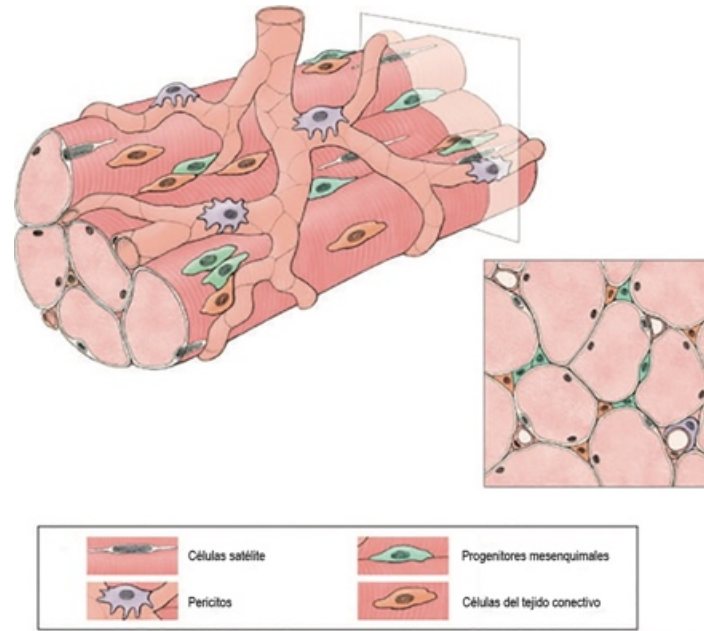


Figura 4 - Miofibras y células madre.
Fuente: Pannerec 2012 (7)

IV. Moléculas de señalización y fenotipos celulares.

Multitud de proteínas actúan como **señales** sobre los distintos fenotipos celulares que se activan tras la lesión muscular aguda. Estas células con fenotipos característicos están espacialmente distribuidas y varían en función del tiempo transcurrido desde la lesión. Por lo tanto, es posible desarrollar **tratamientos biológicos** basados en el uso de estas señales celulares (proteínas) para actuar sobre las células presentes en la lesión en cada etapa de la reparación (distintos fenotipos celulares).

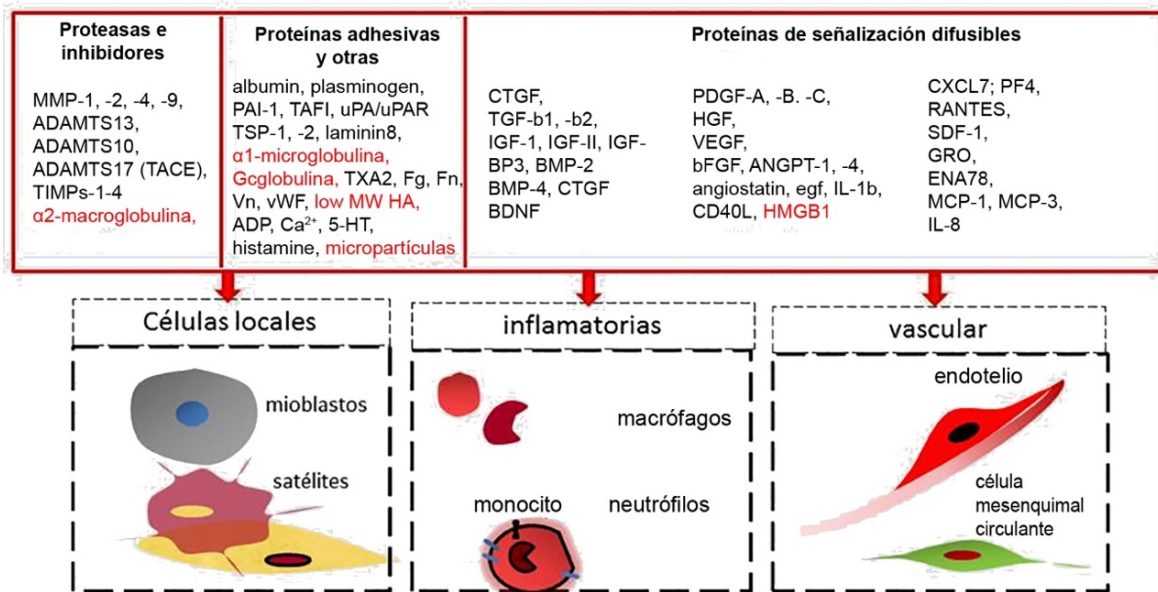


Figura 5 - Señales moleculares y células sobre las que actúan.
Fuente: Andia, 2013 (modificada) (8).

V. **La placa motora.**

Representa la zona de unión entre el nervio y el músculo, y está formada por una motoneurona, cuyo axón se divide en varias ramas en su parte distal, y el conjunto de las fibras musculares que inerva. El impulso eléctrico se transmite por el axón hasta la zona terminal, donde se produce la entrada de iones calcio y se libera el neurotransmisor acetilcolina a la hendidura sináptica. En la membrana de las fibras musculares existen receptores de acetilcolina cuya activación provoca la despolarización de la célula (posteriormente interviene para desactivarla la enzima acetilcolinesterasa, que se encuentra en la matriz extracelular). El potencial de acción se transmite hasta el sistema de membrana celular característico: el sistema tubular transverso. Son invaginaciones de la membrana hacia el interior celular, unidas al retículo sarcoplasmático, lo que permite la rápida liberación de calcio (y su posterior acúmulo), y la contracción muscular (9).

1.1.2 Función

La contracción muscular es la tensión generada en el músculo por un único estímulo nervioso (activación neuromuscular). Para que exista un aumento en la tensión muscular, es necesario que llegue un segundo estímulo nervioso antes de que el músculo vuelva a la situación de reposo: contracción emparejada, por un fenómeno de sumación. Si se aumentan las frecuencias de estimulación, se produce un aumento de las tensiones máximas. Se puede llegar a producir una meseta de tensión máxima, en donde no hay relajación de la tensión entre los estímulos sucesivos (tetania). A pesar de que las unidades motoras se contraen de modo todo o nada, el músculo esquelético tiene la capacidad de producir distintos grados de fuerza. Es debido principalmente a dos mecanismos aditivos: espacial (al aumentar la intensidad del estímulo se activan más unidades motoras) y temporal (al aumentar la frecuencia del estímulo aumenta la tensión por cada unidad motora). También pueden influir otros factores, como el ángulo de penetración (ángulo de las fibras respecto al eje de generación de fuerza), y la densidad y longitud de las fibras musculares (2).

En relación con el tipo de contracción muscular, puede producirse un acortamiento del músculo con la misma tensión (contracción isotónica; la carga es constante) o a la misma velocidad (isocinética). También es posible la contracción muscular sin modificar la longitud (isométrica).

Cuando se producen modificaciones en la longitud del músculo y en la tensión, se distingue la contracción concéntrica (disminución de la longitud) y excéntrica (aumento). En la contracción excéntrica se produce tensión muy alta rápidamente, por lo que existe riesgo más elevado de lesión.

Existen principalmente tres tipos de fibras musculares:

- Fibras tipo I (contracción lenta; metabolismo oxidativo). Tienen capacidad aeróbica alta, con resistencia a la fatiga. La concentración de capilares y mitocondrias es la más alta, mientras que la contracción y la relajación son las más lentas.
- Fibras tipo IIA (contracción rápida; oxidativas y glucolíticas). Son fibras de características intermedias entre las I y las II B.
- Fibras tipo IIB (contracción rápida; glucolíticas). Su metabolismo es principalmente anaeróbico, con baja resistencia a la fatiga. El tiempo de contracción es rápido.

El patrón de especialización de las fibras de tipo II depende de los patrones de expresión de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina durante la histogénesis. Además, el entrenamiento produce cambios adaptativos en las fibras. El entrenamiento de resistencia o aeróbico mejora la circulación sanguínea y la eficiencia energética. Aumenta el tamaño, número y densidad de las mitocondrias, con aumento del consumo de ácidos grasos respecto al glucógeno. También aumenta el porcentaje de fibras IIA. Con el entrenamiento de la fuerza se produce una mejora en la sincronización de la activación muscular y aumento del número de fibras que forma la unidad motora. También se produce un aumento del tamaño de las fibras musculares (hipertrofia) y del porcentaje de las fibras IIB.

1.1.3 Los músculos isquiotibiales

El grupo muscular de los isquiotibiales, también llamados isquiosurales, está formado por tres músculos: bíceps femoral (BF), constituido por un vientre muscular largo y el corto, el semitendinoso (ST) y el semimembranoso (SM).

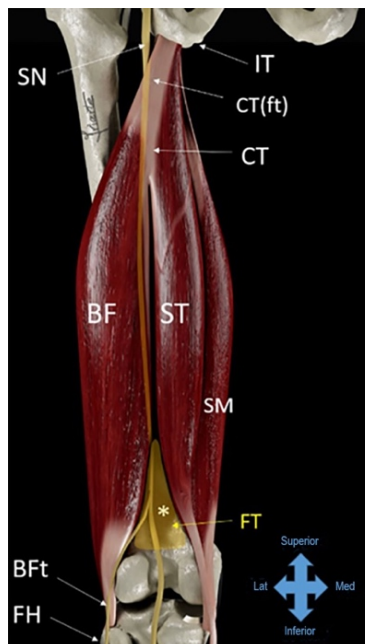


Figura 6 - Músculos Isquiotibiales.
 IT: Tuberosidad Isquiática, SN: Nervio ciático, CT: Tendón Conjunto,
 FT: Tejido graso; FH: cabeza del peroné. Fuente: Iriarte, 2019 (10).

El origen se encuentra en la tuberosidad isquiática. El vientre muscular largo del BF y el ST forman un **tendón conjunto** a este nivel (11), y su lesión suele implicar un peor pronóstico (12). Tiene una longitud orientativa de unos 10 centímetros, mientras que su continuación, el **tendón intramuscular o aponeurosis**, suele tener una longitud en torno a los 15-20 cm. La parte distal del bíceps femoral también presenta un tendón intramuscular y un tendón libre de fibras musculares. El semitendinoso tiene un rafe en la zona media del vientre muscular (tejido conectivo).

Las principales funciones de los isquiotibiales son la extensión de la cadera y la flexión de la rodilla. Intervienen en la carrera tanto en fase de apoyo (extensión de cadera, junto a otros músculos) como de balanceo (flexión de rodilla).

En la fase de balanceo durante el sprint (pierna no apoyada), en la parte final de este movimiento, se activan los isquiotibiales. La rodilla se extiende y el músculo se está alargando, mientras se contrae para poder absorber la energía (contracción excéntrica). Esto implica un gran nivel de tensión a nivel del músculo, por lo que existe mayor riesgo de rotura muscular.

1.2 LA LESIÓN MUSCULAR

La lesión muscular implica un daño muscular que puede presentarse de distintas formas. Habitualmente se describen dos tipos principales de lesiones estructurales:

- Contusión muscular. Es una lesión por golpe directo, con hematoma e inflamación asociados. En el proceso de reparación suele existir un grado variable de fibrosis y de regeneración muscular. En algunas ocasiones, varias semanas después de la lesión se forman calcificaciones dentro del músculo (miositis osificante).
- Rotura muscular. Se produce rotura de las fibras (lisis de las membranas celulares), con frecuencia por estiramiento de un músculo activado (contracción excéntrica). El riesgo de rotura es mayor en los músculos que atraviesan dos articulaciones, como los isquiotibiales, el recto femoral o los gemelos. Son frecuentes las lesiones a nivel de la unión entre el músculo y el tendón (unión miotendinosa o UMT). Si se produce una rotura completa del músculo (sección muscular), el organismo tiende a la reparación de los extremos mediante la formación de un tejido conjuntivo denso y fibroso.

1.2.1 Clasificaciones de la lesión muscular

En el ámbito del deporte, y en el fútbol en particular, la lesión muscular aguda es la patología más frecuente (13), tanto en hombres como en mujeres (14). Se produce, generalmente, cuando es necesario desarrollar una velocidad máxima en una acción específica de juego (15).

Durante décadas se desarrollaron distintas clasificaciones estableciendo sistemas de gradación de la lesión (grados I-II), basados fundamentalmente en hallazgos exploratorios y ecográficos, como el tamaño de la lesión, asociándose un grado mayor a un peor pronóstico (16). En los últimos años se han realizado numerosas clasificaciones sobre las lesiones musculares, atendiendo principalmente a aspectos anatómicos de la localización de la lesión y/o al mecanismo lesional. Dos de las más importantes son:

- **El consenso de Munich de la lesión muscular** (2013). Basada en los síntomas, la exploración y los hallazgos ecográficos o de RMN (17).
- **La clasificación Británica de la lesión en atletas** (2014). Basada en hallazgos de RMN (18).

La gran variedad de grupos musculares, con características anatómicas propias y las múltiples lesiones posibles, hacen muy compleja una aproximación global a la caracterización de la lesión muscular.

Clasificación de la Sociedad Española de Traumatología del deporte.

Tanto en estudios recientes como en la experiencia de cientos de casos durante las últimas décadas dentro de los Servicios Médicos del Athletic Club, se observa una relación importante entre la localización histológica de la lesión y el pronóstico. Un mayor daño del tejido conectivo (matriz extracelular) orienta a una mayor duración de la baja en el deportista (19).

En el año 2020, el grupo de estudio de músculo y tendón de la Sociedad Española de Traumatología del Deporte presentó un interesante artículo en el que se destaca la importancia de describir el daño del **tejido conectivo** sufrido en la lesión muscular, junto a la clásica descripción topográfica (20). Distinguen cuatro grupos de lesión:

1. **Tendinosa o aponeurótica.** Se considera aponeurosis al tendón intramuscular, aunque ambos conceptos se suelen usar indistintamente. Tiene menor grosor y suele ser más aplanado. Puede producirse una rotura transversal (peor pronóstico), longitudinal, o mixta. También puede llegar a visualizarse un espacio en el tejido conectivo, y en ocasiones también retracción en las fibras musculares en roturas transversas.
2. **Miotendinosa o mioaponeurótica.** Lesión en la interfase tendón-músculo, que produce afectación de fibras musculares, el perimio (tejido conectivo que envuelve los fascículos de fibras) y el endomio (tejido conectivo entre fibras), y posible afectación del tendón. Tiene mal pronóstico. La parte más débil de la estructura funcional hueso-tendón-músculo es la unión miotendinosa, que puede dañarse de manera periférica o central.
3. **Intramuscular.** Afectación del músculo sin lesión evidente de la aponeurosis. Tiene buen pronóstico.

4. Miofascial. Lesión en la periferia del vientre muscular, con afectación o no del epimio (fascia que envuelve al músculo). En caso de no lesionarse la fascia, se suele visualizar líquido bien delimitado (sangrado). Si se rompe, suele existir líquido en los planos intermusculares. En cualquier caso, suele tener buen pronóstico.

1.2.2 Lesión en los isquiotibiales

El grupo muscular más afectado en el fútbol son los isquiotibiales (21): bíceps femoral, semitendinoso y semimembranoso. A nivel profesional, el 22% de los jugadores presentan al menos una lesión de isquiotibiales por temporada, con una media de 1,2 casos por cada 1000 horas de exposición (22). También es elevado el índice de recidivas, alrededor de un 20% en el primer año (23), lo que supone una gran pérdida del rendimiento y elevados costes económicos para los equipos (24).

El jugador/a refiere generalmente un dolor agudo intenso en la zona posterior del muslo, con impotencia funcional asociada que obliga generalmente al cese de la actividad. A la exploración, aparece dolor local a la palpación, con el estiramiento de los isquiotibiales (flexión de cadera y extensión de rodilla, o flexión de cadera con la extremidad en extensión) y con la contracción muscular (flexión de rodilla en decúbito prono, contra resistencia).

El diagnóstico de la lesión muscular en los isquiotibiales se basa también en las pruebas de imagen: ecografía (25) y resonancia magnética (26), de forma aislada o complementaria. Permiten valorar la gravedad de las lesiones musculares, evaluando la localización exacta de la rotura, la afectación del tejido conectivo, la presencia o no de hematoma y cambios en el aspecto del tejido perilesional.

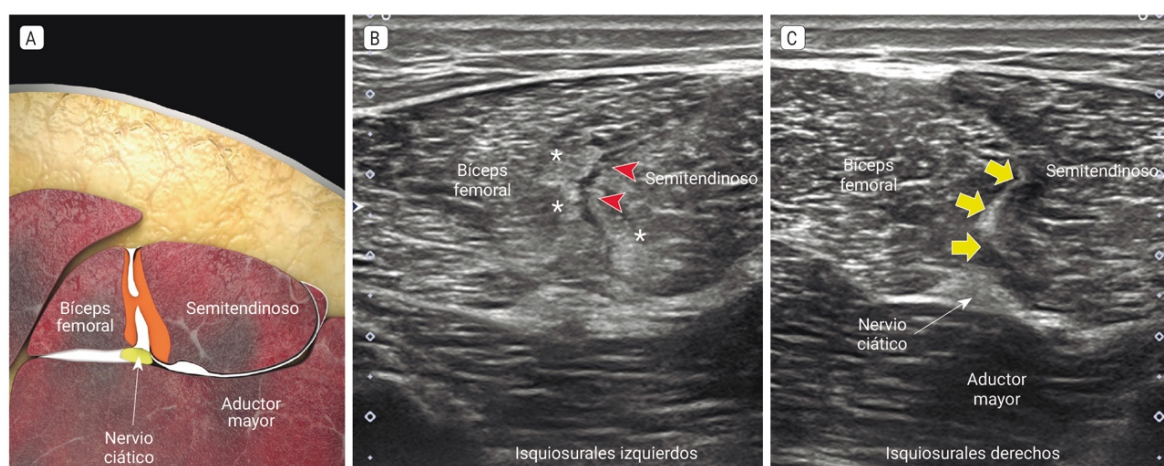


Figura 7 - Lesión en la aponeurosis conjunta Bíceps Femoral-Semitendinoso. "Ecografía Musculoesquelética". Iriarte, 2019.

1.2.3 Pronóstico

El pronóstico de una lesión muscular depende de múltiples factores y, por lo tanto, la duración de la baja deportiva es muy variable, desde pocos días hasta numerosas semanas. Tal y como se ha comentado con anterioridad, se considera que una mayor afectación de tejido conectivo implica peor evolución de proceso, con mayor tiempo necesario para la vuelta al juego y mayor incidencia de recidivas de la lesión. Por lo tanto, la afectación de un tendón a nivel de su origen o inserción es de peor pronóstico (27). Están en discusión continua otros posibles factores que parecen tener menor relevancia pronóstica, como el tamaño del edema (longitud y área transversal), volumen de tejido lesionado o el grado asignado a la lesión (28).

En un interesante artículo del año 2013, Ekstrand y colaboradores aplicaron y validaron la clasificación de Munich de la lesión muscular (29). Para ello, se registraron y analizaron un total de 393 lesiones musculares en el muslo, de 31 equipos europeos masculinos de fútbol profesional, acontecidas durante la temporada 2011/12. A nivel de los músculos isquiotibiales, se registraron 193 lesiones estructurales, de las cuales 143 fueron roturas parciales menores, 47 fueron parciales moderadas y 3 fueron subtotalet o completas (avulsión tendinosa). El tiempo de baja deportiva de cada grupo fue:

- Lesiones parciales menores: $17,3 \pm 16,9$ días.
- Lesiones parciales moderadas: $35,5 \pm 19,5$ días.
- Lesiones subtotalet o completas: $56,3 \pm 4,5$ días.

Entre las lesiones con peor pronóstico, en distintos estudios son destacadas las lesiones proximales del **tendón conjunto** (“tendón libre”) (12). También presentan muy mal pronóstico algunas lesiones distales de la unión miotendinosa del bíceps femoral. Al unirse la cabeza larga y la corta del músculo BF, se forma una aponeurosis compleja en forma de T. Puede lesionarse y provocar una afectación de ambos vientres musculares (“lesión en cremallera”). Además, la inervación de cada vientre muscular es diferente. Por todo ello, existe una alta tasa de recidivas en este tipo de lesión, superior al 50% en algunas series (30).

Dentro de las lesiones parciales moderadas, **las lesiones de la unión miotendinosa** (o unión mioaponeurótica) también tienen mal pronóstico, aunque no son tan graves como las anteriores (31). En cambio, **las lesiones intramusculares y las miofasciales** tienen mejor pronóstico.

Además, a nivel estructural, es posible la presencia simultánea de distintos tipos de lesiones: afectación del tendón conjunto, lesión de la unión miotendinosa y lesión intramuscular o miofascial. En estos casos, definir el pronóstico de la lesión implica una mayor complejidad.

1.2.4 Tratamientos habituales

Aunque las lesiones musculares en deportistas de élite suponen grandes pérdidas económicas para las entidades deportivas (24), en las últimas décadas no se han producido grandes avances en el tratamiento de estas lesiones.

El tratamiento inmediato que se aplica se conoce como “RICE”, de las siglas en inglés de Rest (descanso), Ice (hielo), Compression (compresión) y Elevation (elevación). Hotfiel, en el año 2021, indicó que no existen ensayos clínicos randomizados que demuestren su eficacia (32), pero estos 4 principios están basados en conceptos fisiológicos y traumatológicos ampliamente aceptados.

El descanso evita la retracción adicional de los muñones del músculo roto, impidiendo que aumente el tamaño de la discontinuidad en la zona lesionada, reduciendo el tamaño del hematoma y de la posible cicatriz. Con respecto al hielo, se ha comprobado que su aplicación inmediata reduce el tamaño del hematoma, se produce menos inflamación y se acelera la regeneración tisular. La aplicación de hielo durante 15-20 minutos en intervalos de una hora disminuye la temperatura intramuscular 3-7°C y consigue reducir el sangrado hasta en un 50%. Se recomienda la elevación de la extremidad lesionada por encima del nivel del corazón, para reducir la presión hidrostática y la acumulación de fluidos intersticiales.

Además, es habitual el uso de analgésicos como el paracetamol o antiinflamatorios no esteroideos (AINES), como el ibuprofeno, aunque el uso de estos últimos está en discusión.

También se ha propuesto el drenaje del hematoma, en el caso de existir una colección sanguínea, con el fin de evitar una fibrosis asociada al hematoma.

Las mejoras en el tratamiento de fisioterapia y de readaptación, con el desarrollo de estrategias progresivas en los ejercicios y con la evaluación de la progresión del deportista, si ha conseguido una mejor adaptación a las cargas de trabajo y un retorno al juego con un nivel de riesgo menor que en décadas pasadas (33).

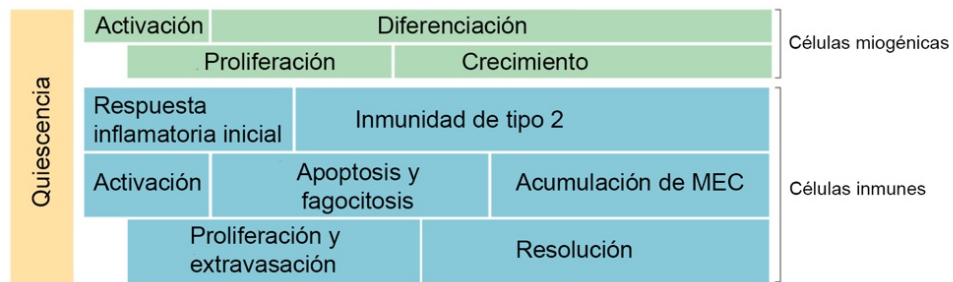
1.3 REGENERACIÓN DE LA LESIÓN MUSCULAR

La regeneración tisular se define como el conjunto de procesos celulares y moleculares que acontecen para sustituir el tejido dañado por otro nuevo, con el resultado final de una recuperación completa estructural y funcional. Existen tres elementos fundamentales para conseguir la regeneración del tejido: las células, el andamiaje o matriz y las moléculas bioactivas de señalización, como las citoquinas o los factores de crecimiento. Existen multitud de tipos celulares implicados en la regeneración celular. Es importante conocer los distintos linajes celulares que pueden estar implicados (ver anexo 4, hematopoyesis).

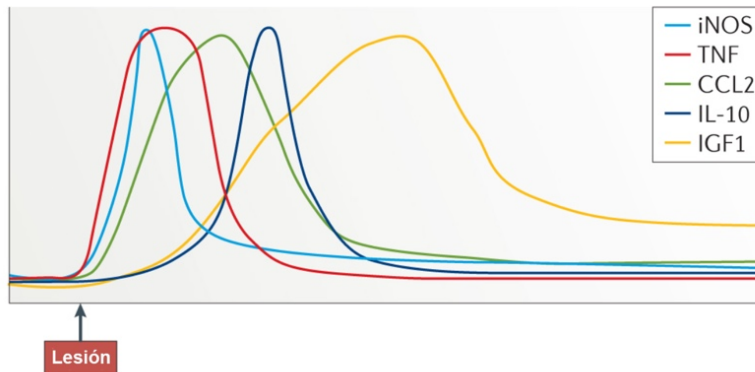
La reparación de un tejido hace referencia de manera genérica al proceso de la **curación** que se inicia tras la lesión. Algunos autores lo utilizan cuando el tejido dañado es sustituido por otro de peor calidad, con cierto grado de fibrosis y una menor capacidad funcional (curación parcial) (34). Cabe destacar que, en el año 2021, Roman y colaboradores publican un artículo describiendo por primera vez la reparación del músculo esquelético independientemente de las células satélite (35). Se observó que durante el ejercicio se producen pequeñas lesiones locales que desencadenan cascadas de señalización con calcio, proteína Cdc42 (regula el ciclo celular) y la fosfoquinasa C. Los núcleos de las fibras musculares, cuya función principal es la síntesis de proteínas, se dirigen al lugar dañado a través de los microtúbulos y la dineína, facilitando la reparación del sarcómero y la entrega local de ARN mensajero para la reconstrucción celular.

El término **regeneración muscular** ha dado lugar a confusión y se ha mezclado con otros como hipertrofia. Para hablar de regeneración muscular, Grounds y colaboradores destacan la necesidad de que se produzcan **necrosis de fibras musculares** (destrucción celular) (36). A continuación, se producen varios procesos interconectados y encaminados a la **recuperación estructural y funcional del tejido**: inflamación, miogénesis (36), angiogénesis (37), neurogénesis (38) y depósito y remodelación de la matriz extracelular (39), (40).

Tidball, en un artículo muy interesante del año 2017, explicó la importante secuencia temporal en las modificaciones locales de las concentraciones celulares, tras la lesión muscular aguda (41). Se van superponiendo los distintos procesos que forman parte de la regeneración muscular, tanto por parte de las células miogénicas como por parte de las células inmunes (Figura 8).



Mediadores solubles



Respuesta celular

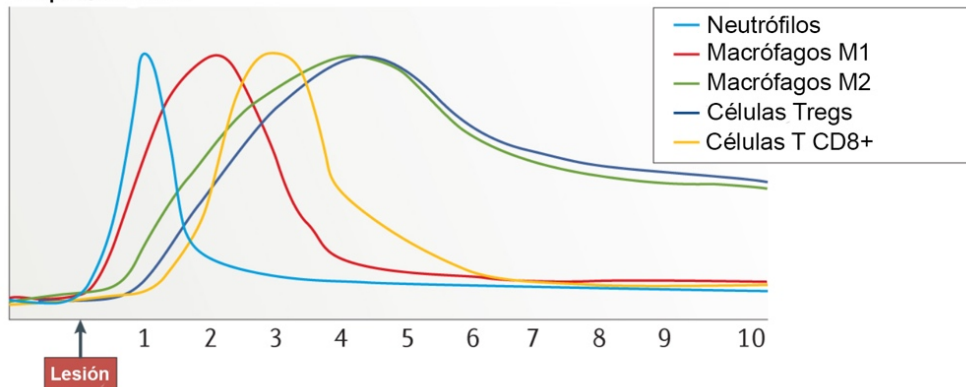


Figura 8 - Fases iniciales de la miogénesis
Fuente: Tidball, 2017 (41).

1.3.1 Respuesta Inflamatoria

La inflamación es la consecuencia de la invasión y acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y líquido, derivados de la sangre, en un tejido extravascular infectado o dañado. Representa el mecanismo fundamental mediante el cual el sistema inmune innato se enfrenta a las infecciones y a la lesión tisular.

Durante las primeras 24 horas, la respuesta inmunitaria se caracteriza por niveles elevados de citoquinas (ej.: $\text{TNF-}\alpha$) y quimiocinas (ej.: CCL2), que favorecen la respuesta inflamatoria en el tejido, y promueven el reclutamiento de células mieloides y linfoides.

Tras producirse la ruptura de fibras musculares y la necrosis tisular, comienza la respuesta inflamatoria aguda. Se liberan al medio extracelular moléculas asociadas al daño tisular denominadas **DAMPs** (Damage Associated Molecular Patterns), que son reconocidas por las células centinela tisulares, principalmente macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Los mastocitos secretan mediadores (histamina, prostaglandinas) que actúan sobre los capilares favoreciendo el aumento del flujo sanguíneo, la llegada de proteínas plasmáticas y la migración de los leucocitos hacia el tejido dañado. Los macrófagos y las células dendríticas secretan importantes citoquinas inflamatorias como el **TNF- α** (activación de plaquetas, células endoteliales y fibroblastos), y las **IL1, IL6 e IL12**.

Se produce la activación de las células madre del tejido muscular, las células satélite, que pasan de un estado quiescente a entrar en el ciclo celular e iniciar la proliferación. También se produce el reclutamiento de un gran número de células del sistema inmune mieloides desde la sangre hacia el tejido lesionado (42), principalmente neutrófilos seguidos de monocitos.

Los neutrófilos

Son los responsables de liberar la **enzima mieloperoxidasa (MPO)**, que cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso, un potente agente oxidante implicado en numerosas reacciones, como la oxidación de las moléculas lipídicas LDL. Puede contribuir a la defensa frente a agentes infecciosos, pero también puede provocar daño en el tejido (43). El aumento progresivo de neutrófilos se produce de forma rápida e intensa, aproximadamente desde la 2ª hora tras la lesión hasta transcurridas 24 horas (41).

Estimulados por la IL-12, los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos T Natural Killer secretan gran cantidad de la citoquina **interferón gamma (INF- γ)**. Provocan el reclutamiento de monocitos y la activación de un mayor número de macrófagos, diferenciación de los propios LT hacia LT colaboradores tipo 1 (LTh1) y aumenta la actividad citotóxica. También pueden producir IL-12, lo que supone un sistema de retroalimentación positiva (44).

Existen otros tipos celulares que colaboran en el proceso inflamatorio, como las células endoteliales. Liberan óxido nítrico, que provoca vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular local y reclutamiento celular (45).

Macrófagos e inflamación

Las principales funciones de los macrófagos son microbicidas, proinflamatorias y regenerativas. En el ámbito de la regeneración tisular, su papel es fundamental en las etapas iniciales. Tras producirse la lesión, se acumula un gran número de macrófagos en el tejido dañado, y experimentan una polarización gradual (cambio de fenotipo) en función de las moléculas presentes en el micro entorno de la lesión. Los macrófagos sufren transiciones de fenotipos temporales, en un espectro de polarización que pasa de M1 (inflamatorio) a M2 (reparativo).

Actualmente, se investigan las características de los fenotipos intermedios y su influencia en la reparación. Por ejemplo, se ha hipotetizado que el PRP influye en la polarización, y que el control de dicha polarización puede determinar el éxito de la regeneración tisular. Las investigaciones en curso tratan de identificar moléculas neo-sintetizadas por los macrófagos y su influencia en la regeneración en condiciones fisiológicas y patológicas.

La secuencia temporal de polarización de los macrófagos, y la duración del predominio de cada etapa, están directamente relacionadas con la posible formación de fibrosis. Se ha observado que un aumento inicial de M1 produce más mioblastos y menos miofibroblastos, lo cual implica predominio de miogénesis versus fibrosis (46).

La activación de los macrófagos se realiza de diferentes formas, dependiendo del entorno molecular. En la fase inflamatoria inicial que se produce tras la lesión del tejido, habitualmente se considera que los macrófagos se activan por la vía clásica: inmunidad innata. Esto se discutirá más adelante (apartado 5.2.2). Presentan una actividad pro-inflamatoria (fenotipo M1). Entre sus funciones, destaca **fagocitar** restos celulares (unión de LDL oxidadas-Receptor CD68), liberar óxido nítrico, que produce vasodilatación y edema local asociado, y también la liberación de TNF- α e INF- γ .

Los macrófagos sintetizan diferentes **interleucinas**, como la IL-1, que puede producir efectos paracrinos en su entorno (IL-1 α), o ser secretadas y unirse a receptores que se encuentran en la mayoría de las células (IL-1 β), provocando la síntesis y liberación de prostaglandinas (pirógenos) y la activación de LT-colaboradores. También liberan **factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1)**, lo que aumenta la proliferación de las células satélite (47), en las que inicialmente esta inhibida la expresión de los genes de diferenciación. Se produce la migración de las células satélite hacia la lesión (48).

El periodo de aumento de los macrófagos M1 abarca aproximadamente desde la 2ª hora hasta las 48 horas (41).

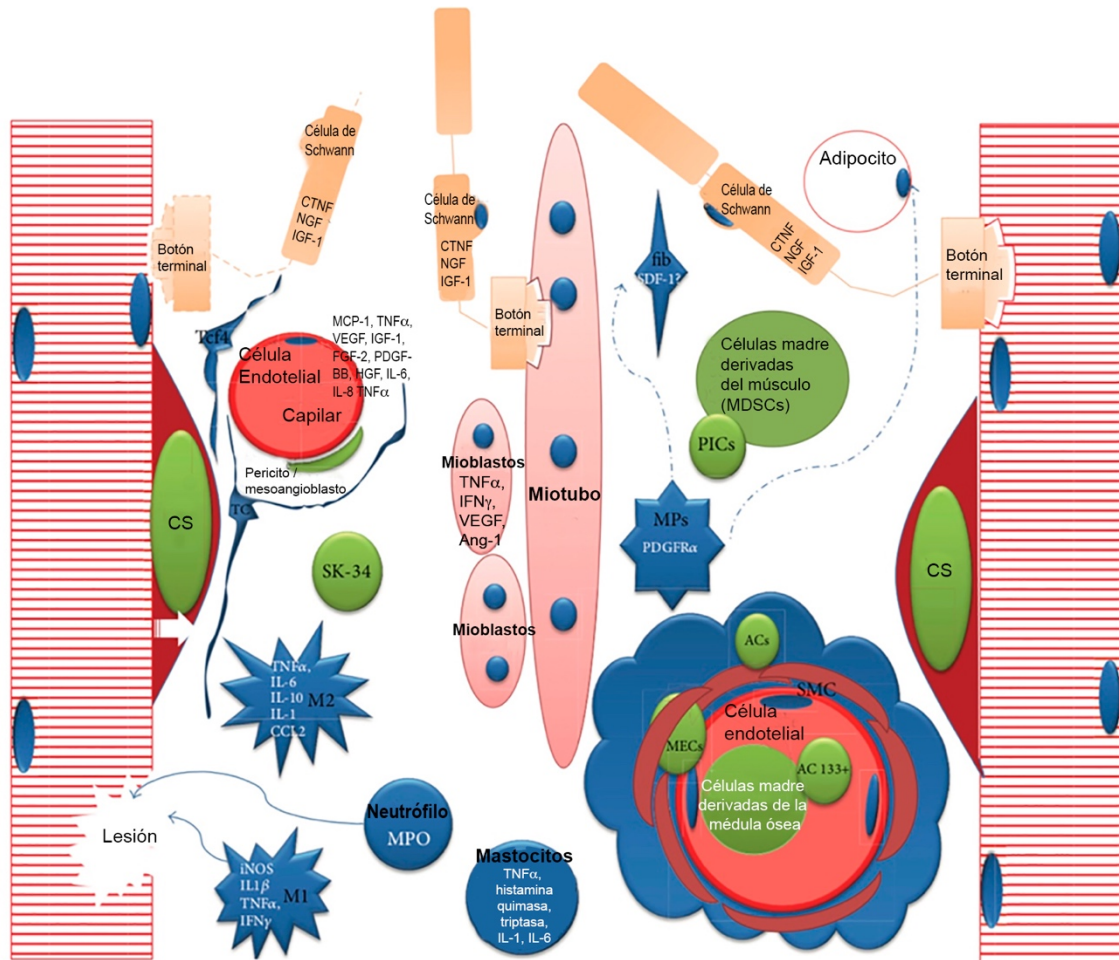


Figura 9 - Lesión muscular y espacio intersticial en el músculo esquelético.

Diferentes poblaciones de células madre se activan (en verde), y progresivamente se diferencian y fusionan. Es necesario el apoyo de distintas células intersticiales y células derivada de la sangre (azules), mediante contacto físico o por señalización paracrina. Fuente: Ceafalan, 2014 (49).

SC: Célula satélite; MPs: progenitores mesenquimales, como los progenitores PDGFR α +, los FAPs (progenitores fibroadipogénicos), y los progenitores Tie2+; PICs: células intersticiales PW1+/Pax7; TCs: telocitos; fibroblastos positivos a Tcf4; células SK-34; fib-SDF-1: fibroblastos; Macrófagos M1 y M2; MECs: células endoteliales miogénicas; ACs: células adventiciales; SMC: células musculares lisas.

Los macrófagos activados por la **vía alternativa**, favorecen la reparación del tejido. Son macrófagos activados por la IL-4 y la IL-13, producidas principalmente por los LTh2 y otros leucocitos. Existen otros posibles estímulos de la vía alternativa, como la degradación del coagulo de fibrina por la acción de la enzima plasmina o el propio proceso de fagocitosis. El fenotipo que expresan es M2, que comprende varias subpoblaciones. Algunas son principalmente antiinflamatorias y otras participan en la reparación tisular.

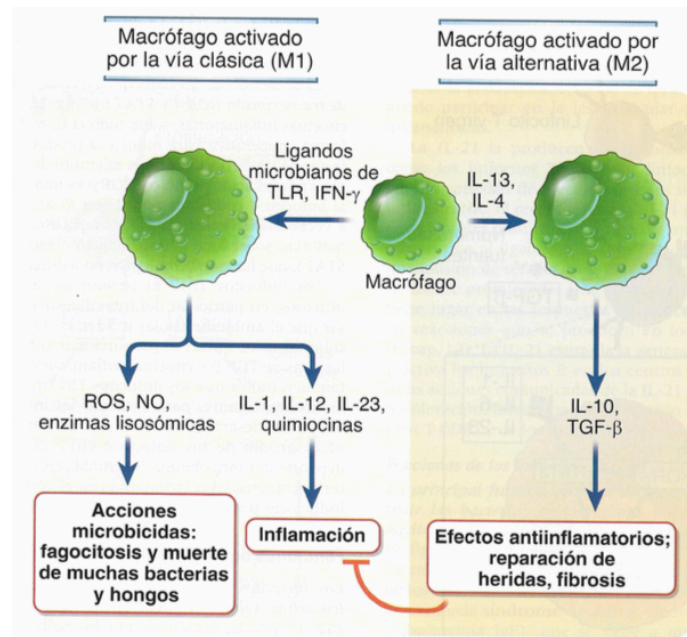


Figura 10 - Activación de los macrófagos: clásica vs alternativa.
Fuente: Abbas, Lichtman, Pillai, 10ª edición, 2022 (44).

Sus funciones principales son controlar la inflamación y promover la reparación del tejido y la fibrosis. La principal responsable de la acción antiinflamatoria es la **IL-10**, que inhibe citocinas como $INF-\gamma$ o $TNF-\alpha$, favorece también el cambio de los LTh1 hacia LTh2, y continúa la proliferación de los mioblastos (50).

Los macrófagos M2, junto con las plaquetas y las células endoteliales, también secretan **Factor de Crecimiento Transformante Beta ($TGF-\beta$)**, que activa los receptores de membrana de distintas células, implicando múltiples acciones. Provoca la fosforilación de factores de transcripción citoplasmáticos que entran en el núcleo y activan o inhiben distintos genes en función del entorno. Puede estimular a las células progenitoras fibro adipogénicas (FAP) del tejido intersticial, que al secretar IL-33 favorecen el reclutamiento de LT reguladores.

El aumento progresivo de macrófagos M2 se produce en el periodo de las 20-96 horas, aproximadamente; el aumento de LT-reguladores se produce en un periodo similar: alrededor de las **24-96 horas** (41).

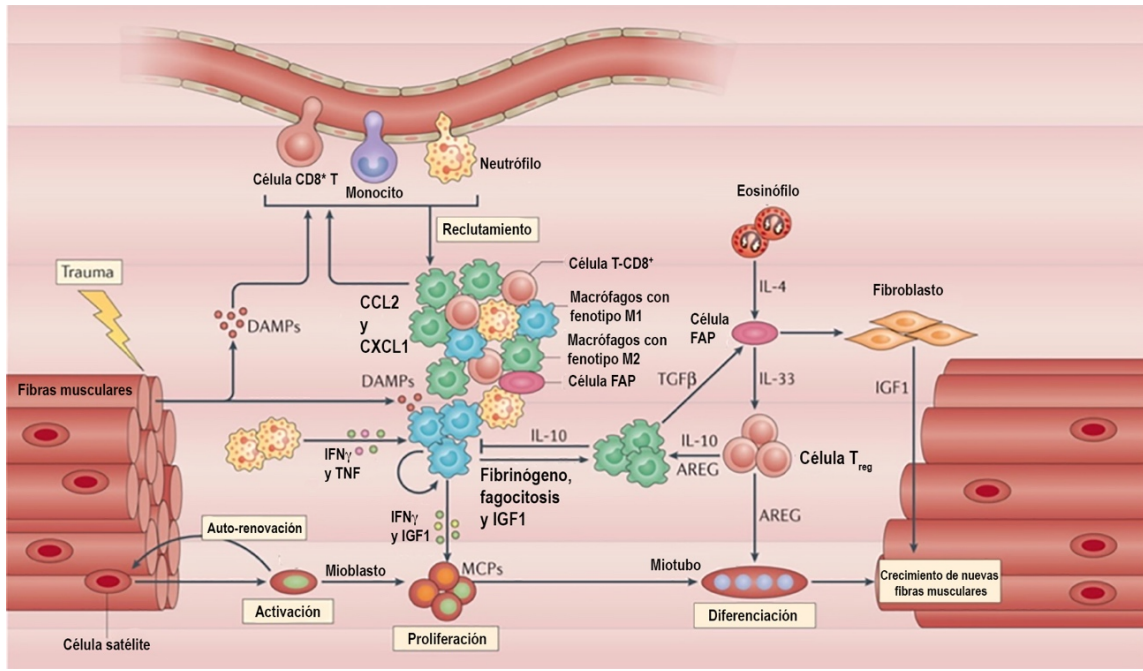


Figura 11 - Regulación de la regeneración muscular por el sistema inmune.
Fuente: Tidball 2017, (41).

Linfocitos T

En contraste con la invasión de gran número de células mieloides en la fase aguda, el número de células linfoides es muy reducido y su papel en la regeneración muscular ha sido menos investigado.

Los linfocitos T son los mediadores de la inmunidad celular. Existen dos principales subpoblaciones, que se definen por la expresión en superficie celular de proteínas CD4 y CD8:

- **LT CD4+ colaboradores (LTh)**. Sus funciones son la activación de linfocitos B (inmunidad humoral), activación de macrófagos (inmunidad celular) y la estimulación de la inflamación.
- **LT CD8 + citotóxicos (LTc)**. Reconocen y matan a células infectadas por virus y otros microbios que pueden estar dentro de las células, y también pueden matar a células tumorales.

Ambos tipos celulares expresan receptores para el antígeno $\alpha\beta$ del linfocito T (TCR).

En la regeneración tisular es fundamental otra subpoblación:

- **LT reguladores**. Son LT CD4+, y también presentan el receptor TCR. Su función principal es la supresión de la función de otros LT. De este modo, regulan las respuestas inmunitarias, y mantienen la tolerancia frente a lo propio (51). Favorecen un ambiente pro-regenerativo, liberando IL-10 (inhibe la acción de la IL-12), y gran cantidad de “**amphiregulin**” (conocida también como AREG), que estimula la **diferenciación** de los mioblastos: aumenta la expresión de factores reguladores de la actividad celular y facilita la fusión de los miotubos,

hasta formar finalmente miofibras (52). Cabe destacar que sus receptores para el antígeno $\alpha\beta$ presentan especificidad para antígenos propios, lo que podría tener implicaciones en la regeneración muscular y se discutirá en la parte final del trabajo (apartado 5.2.2).

1.3.2 Miogénesis

La formación de nuevas fibras musculares es un complejo proceso en el que están implicadas numerosas células. Son fundamentales las interacciones que se establecen entre el sistema inmune y el tejido muscular.

Las Células Satélite.

Las células satélite (CS) son una población de células madre adultas localizadas en el músculo. Están implicadas tanto en el crecimiento de las fibras durante el desarrollo postnatal como en la reparación de la lesión muscular (53). Se encuentran habitualmente en un estado quiescente indiferenciado, situadas en la matriz extracelular entre la membrana de la fibra (sarcolema) y la membrana basal, en un microambiente característico llamado nicho celular (54). A lo largo de la regeneración, los comportamientos jerárquicos y colaborativos de las células satélite se ven influidos por los cambios en su nicho. Estos cambios incluyen diversas moléculas, como factores de crecimiento, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz. También incluyen células, como las del Sistema Inmune, que también tienen una gran capacidad de modificar ese microambiente, junto con las neuronas motoras, las células vasculares y las plaquetas (55). Todo ello constituye un nicho dinámico que influye continuamente en las múltiples tareas establecidas para las células satélite (54).

I. Activación y auto renovación

Al producirse la rotura de fibras musculares, las células satélite migran al sitio de la lesión. La lámina basal sirve de andamiaje para orientar su migración y para facilitar su propia auto-renovación (56), manteniendo así la capacidad regenerativa del tejido muscular. El citoesqueleto de las células satélite se ancla en la lámina basal, y las señales mecánicas extracelulares de las miofibras se pueden convertir en señales químicas intracelulares, produciéndose la activación celular (57). También hay determinadas proteínas de señalización que pueden activar las células satélite quiescentes, como la IL-6, que es producida en la zona de la lesión por las miofibras o los macrófagos (58).

II. Proliferación y diferenciación.

La miogénesis está controlada principalmente por una jerarquía de factores de transcripción que incluye **factores reguladores miogénicos (MRF)** y miembros de la familia del **factor potenciador de miocitos 2 (MEF2)**, que coordinan con precisión las actividades de un conjunto de genes musculares (59).

Las células satélite expresan estos factores de transcripción y se activan distintas vías de señalización para la producción de proteínas (60). Las células progenitoras de las células satélite expresan PAX3/PAX7. Al activarse y entrar en el ciclo celular, las células madre expresan MYF5 y MYOD1 (Figura 12). Como ya se ha comentado, otra parte de la población de las células satélite activadas tienen la capacidad de volver a la quiescencia para mantener la capacidad regenerativa muscular. La cantidad en la que se expresan MYF5, MYOD1 y MYOG en las células PAX7+ y su secuencia temporal (aumento inicial y disminución progresiva), regulan y mantienen la proliferación de las CS activadas (54).

La diferenciación terminal se inicia con la disminución progresiva de MYF5 y el aumento de **MEF2C y MYOG**. Posteriormente disminuye MYOG, y varios días después de la inducción de la diferenciación se activa MRF4. Estos factores de transcripción inducen la expresión de genes específicos del músculo, como las proteínas contráctiles miosina y actina, o proteínas relevantes para el metabolismo energético, como la creatinquinasa (cataliza la refosforilación del ADP en ATP) (61).

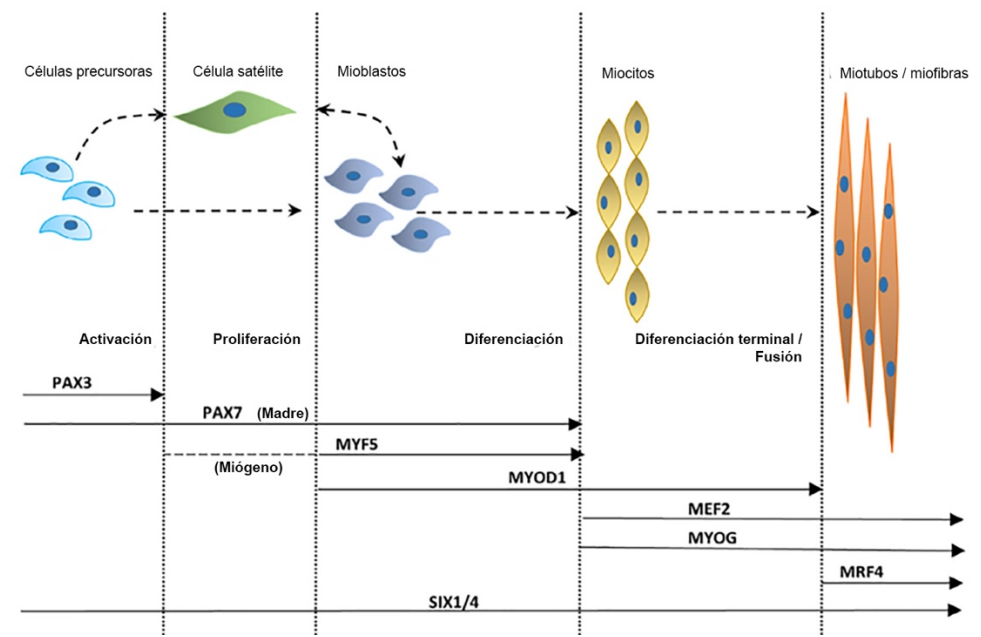


Figura 12 - Miogénesis: activación de los principales factores de transcripción
Fuente: Mukund-Subramaniam, 2019 (61).

También se ha observado que las células satélite que se encuentran activadas expresan proteínas de membrana Scrib. Su distribución en la célula está polarizada, y regula el ciclo celular. En un modelo en ratones, publicado por Ono y colaboradores en el 2015, se observó una expresión baja de Scrib durante el estado proliferativo, mientras que los **niveles altos se asociaron a una reducción de la proliferación** (62). Su eliminación en las células satélite de

ratones evita la regeneración muscular, concluyendo los autores que la proteína Scrib dirige el destino de las células satélite (proliferación o diferenciación). En la misma línea y profundizando en la miogénesis esquelética, Scully y colaboradores publican en el 2019 un artículo describiendo la importancia del **eje PDGF/VEGF-Ciclina D1-MyoD-Scrib-Myogenin**, al regular el ciclo celular e **impulsando la diferenciación** de las células madre musculares, acelerando la regeneración muscular después de una lesión aguda (63). Observaron este efecto de VEGF y PDGF de manera dosis dependiente empleando un modelo ex vivo de fibra única, consiguiendo un aumento de células Pax7-ve/MyoD+ve (comprometidas con la diferenciación) con una mayor exposición al contenido plaquetario. Además, también observaron que la inhibición de los receptores VEGF y PDGF revirtió ese efecto de células comprometidas y de aumento del número total de células satélite. Destacan en sus conclusiones la importancia del secretoma plaquetario en la medicina regenerativa.

III. Fusión celular

Por último, se produce la fusión de los miocitos en miotubos para formar la fibra muscular. Los mecanismos moleculares empleados para esta fusión no son bien conocidos. Recientemente, se han descrito proteínas que intervienen en este proceso, como la proteína transmembrana **Myomaker** y la microproteína **Myomixer** (también llamada **Minion**), que son específicas del músculo esquelético. La expresión simultánea de Myomaker y de Myomixer permite inducir la fusión celular y la posterior reorganización del citoesqueleto (64). Zhang y colaboradores, en el 2017, sugieren un modelo en el que la proteína transmembrana Myomaker induce la interacción de las membranas celulares, posibilitando su alineación, mientras que la microproteína Myomixer impulsa la reorganización citoesquelética, permitiendo su fusión. Ambas proteínas se expresan con intensidad durante el desarrollo y la regeneración muscular. Su expresión se produce sólo durante el periodo de mayor respuesta miogénica, durante la diferenciación y la fusión de los mioblastos, pudiendo estar regulada por MyoD y MyoG (65). También es relevante la presencia de sarcolipina, proteína fundamental en la termogénesis. Actúa sobre las enzimas Calcio-ATPasas del retículo sarcoplasmático, que dejan de bombear iones calcio y continúan hidrolizando ATPs, liberando la energía en forma de calor y aumentando la temperatura celular. Este tipo de proteínas diminutas constituyen un “microproteoma” con funciones críticas en la regeneración tisular.

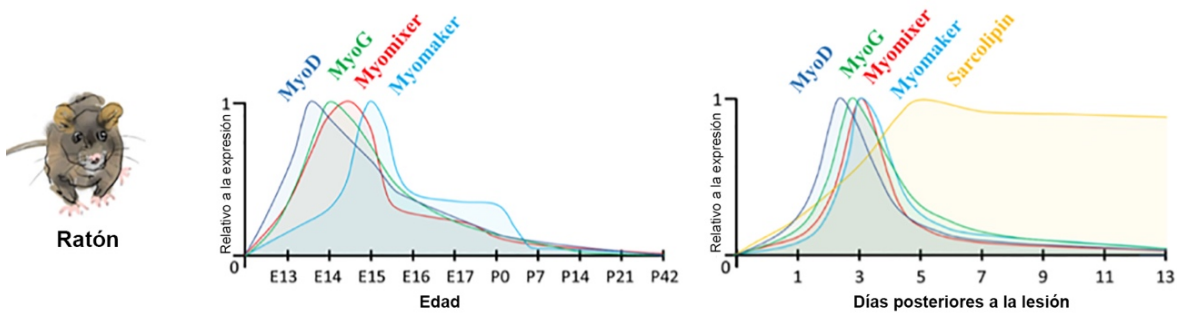


Figura 13 - Patrón de expresión de las proteínas myomaker y myomixer. Embriogénesis y post-parto (a la izquierda), y tras una lesión muscular (a la derecha). Modelo de ratón. Fuente: Chen, 2020 (65).

IV. Otros reguladores de la actividad de las células satélite: microRNAs

Los microRNAs son moléculas de ARN no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos que pueden regular la miogénesis. Controla la expresión génica de las células mediante la destrucción del ARN mensajero (ARNm) o la inhibición de su traducción.

Nakumara y colaboradores, en el año 2015, publicaron un estudio en donde se realizaron lesiones en el musculo tibial anterior de 10 ratones (66). Emplearon **exosomas** de MSCs derivadas de médula ósea humana (vesículas extracelulares con contenido de mRNA y microRNAs). Aislaron los exosomas mediante centrifugación, y los infiltraron en la zona de la lesión. Observaron aumento de la angiogénesis y reducción de la fibrosis, lo que orienta a la posibilidad del uso de este tipo de terapia en la regeneración muscular. También se observó en otros estudios in vitro que las células mesenquimales de placenta, el tejido adiposo, los miofibroblastos, los miotubos o los macrófagos del tejido adiposo pueden modificar la actividad de las células satélite (67).

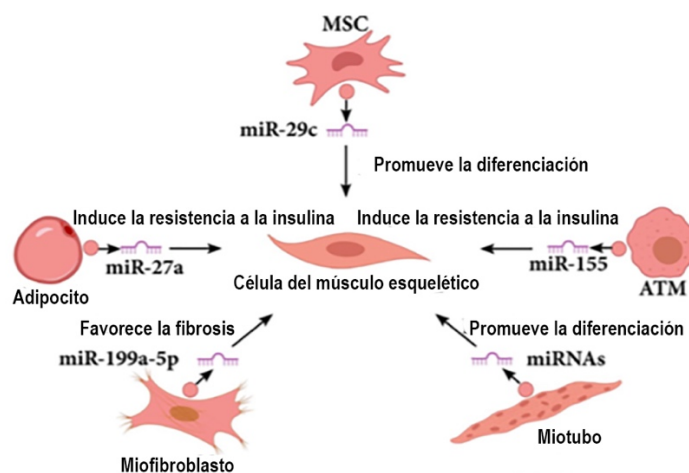


Figura 14 - Transferencia de microRNAs en la regulación de la miogénesis. MSC: Mesenchymal Stromal cell; ATM, adipose tissue macrophages, Fuente: Yue 2020, (67).

1.3.3 Angiogénesis

Para conseguir la recuperación estructural y funcional del músculo lesionado, es fundamental el conjunto de interacciones directas (yuxtacrinias) e indirectas (paracrinias) entre células miogénicas y otras no-miogénicas (68).

Las plaquetas y multitud de células producen y liberan moléculas de señalización como factores de crecimiento y citoquinas, necesarios para la formación progresiva de nuevos vasos sanguíneos y nervios (37).

Los pericitos son células alargadas, con múltiples prolongaciones, que se localizan alrededor de los capilares. Están en íntima relación con la membrana basal, que comparten con las células endoteliales vasculares, situación que se asemeja a la relación entre la fibra muscular y las células satélite. Participan en el mantenimiento de la integridad de los vasos y en la angiogénesis. En el contexto de las lesiones musculares, los pericitos contribuyen a un microambiente regenerativo mediante la liberación de factores tróficos y la modulación de las respuestas inmunitarias locales (69). Se consideran células madre mesenquimales (MSC) y podrían mejorar directamente la curación del tejido al diferenciarse hacia células satélite y miofibras, aunque esto está en discusión (70, 71).

1.3.4 Neurogénesis

También las motoneuronas y las células de Schwann secretan factores como el Factor de Crecimiento Insulínico (IGF-1) y el Nerve Growth Factor (NGF), que pueden contribuir a la formación de nuevos nervios y a la proliferación, diferenciación y fusión de las células satélite/mioblastos (68).

Las células que expresan IL-33, como las células madre fibroadipogénicas (FAP), fueron observadas con frecuencia íntimamente asociadas a estructuras nerviosas (72): en el perineuro, recubriendo la vaina de mielina de las fibras nerviosas, dentro de los haces de nervios, y junto a los husos musculares (conjunto de nervios y miofibras especializadas en la mecano transducción). Desde el punto de vista de la regeneración muscular, esto implica una importante asociación entre las miofibras, el sistema inmune y el sistema nervioso.

1.3.5 Matriz Extracelular, células madre mesenquimales y fibroblastos.

Los principales componentes del tejido conectivo muscular son la Matriz Extracelular (MEC) y las células madre mesenquimales (Mesenchymal Stem Cells o MSC; también llamadas células

mesenquimales estromales). Estas células producen, mantienen y remodelan activamente este andamiaje dinámico durante el desarrollo, la homeostasis y después de un daño tisular.

La Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT) fijó unos criterios mínimos para definir una célula como MSC que han sido ampliamente aceptados (73): 1) Las MSC deben ser adherentes al plástico cuando se mantienen en condiciones de cultivo estándar. 2) Deben expresar marcadores específicos de la superficie celular, como el complejo de diferenciación (CD) 73, CD90, CD105, y carecer de la expresión de las moléculas de superficie CD14 o CD11b, CD34, CD45, CD 79 alfa o CD 19 y del antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR). 3) Deben ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

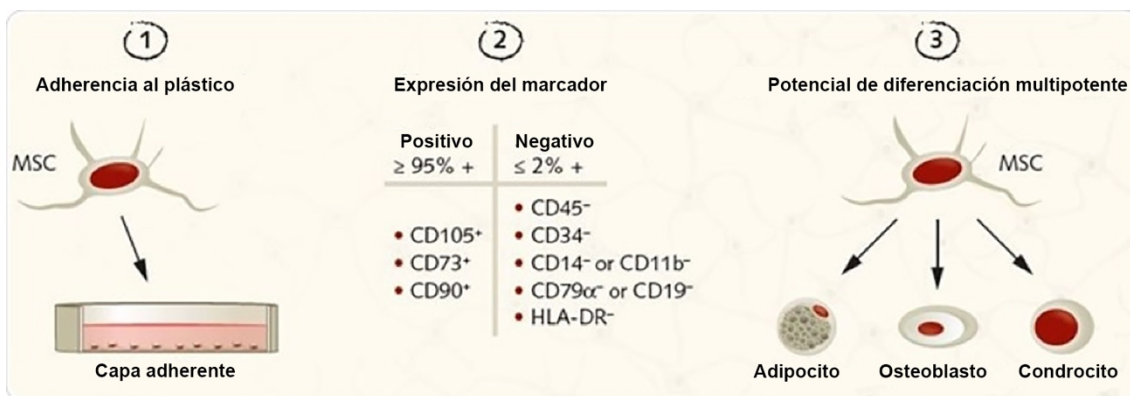


Figura 15 - Criterios mínimos para la identificación de Células Madre Mesenquimales.

Propuesta de la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (ISCT). Fuente: Horwitz, 2005, (74). Image Credit: PromoCell GmbH.

En el año 2017, Caplan, quien acuñó el término célula madre mesenquimal (MSC) en el año 1991, hace referencia a la necesidad del cambio de denominación (75). Sugiere el término "Célula de Señalización Medicinal", debido a que la función de las MSC in vivo es secretora y actúa principalmente en sitios de lesión, enfermedad o inflamación (actividad paracrina terapéutica). Y la ISCT se posiciona en el año 2019 a favor del acrónimo "MSCs" (76), pero recomienda que: 1) Se complemente con el origen tisular de las células, lo que indica las propiedades específicas de los tejidos; 2) Se denominen MSCs con pruebas rigurosas de su carácter de células madre que puedan respaldarse con datos in vitro e in vivo; 3) Se asocie a una base de ensayos funcionales para demostrar las propiedades de las MSC, que se definen en el modo de acción terapéutico previsto.

En el tejido intersticial muscular existen células madre, además de las células satélite, que tienen como función dar soporte a estas últimas, interactuando mediante acción yuxtacrina y paracrina, y potenciando su acción miogénica (77). Las principales MSC en la matriz extracelular muscular son los **progenitores fibroadipogénicos (células FAP)**, capaces de diferenciarse en adipocitos o fibroblastos) y los **pericitos**. Cuando existe una lesión en el músculo, las células FAP contribuyen a la deposición y remodelado del tejido conectivo, aumentando la población de

fibroblastos activados. Contreras et al. (78), en el año 2021, proponen definir como FAP a las células que presentan las siguientes características: 1) Expresa receptores alfa del factor de crecimiento derivado de Plaquetas (**PDGFR α**) a nivel de genes y proteínas. 2) Localización en el intersticio del tejido y comportamiento como una célula perivascular, pero sin residir en la cavidad del vaso sanguíneo. 3) Formadora de colonias in vitro. 4) Puede diferenciarse en fibroblastos activados, adipocitos, condrocitos y osteocitos in vitro e in vivo. Estas células actúan como centros de señalización, recibiendo estímulos y liberando moléculas en el nicho muscular. Influyen en otras poblaciones celulares y viceversa. Por ejemplo, para mantener la población de las células PAF y la síntesis de matriz extracelular, es necesario un equilibrio entre el TNF α (fase temprana tras la lesión) secretado principalmente por los macrófagos M1, y el TGF β 1, antiinflamatorio secretado por los macrófagos M2 (fase posterior) (79).

La secuencia temporal de la expresión/presencia de citoquinas y factores de crecimiento es fundamental para la adecuada regeneración muscular. La pérdida de esta progresión secuencial en condiciones inflamatorias, tanto agudas como crónicas, puede provocar un exceso de TGF- β que estimule la diferenciación masiva de las PAF en fibroblastos, contribuyendo a un entorno fibrótico (61), (80). Por lo tanto, el papel de las células FAP es fundamental en la homeostasis del tejido muscular y el inicio y el establecimiento de la cicatrización.

Los fibroblastos, además del depósito de colágeno y la remodelación del tejido conectivo, también favorecen el crecimiento y desarrollo de las miofibras, mediante la secreción de IGF-1 (81). El daño en el tejido modifica el microambiente e implica como respuesta un cambio de fenotipo en distintas células, como los fibroblastos. Los reguladores transcripcionales desempeñan un papel fundamental en la reprogramación de la identidad y el comportamiento de estas células. Estudios recientes en el músculo cardíaco y esquelético han identificado al factor de transcripción scleraxis como un potente determinante del fenotipo celular en las células que producen grandes cantidades de matriz extracelular, incluidos los tenocitos y los fibroblastos cardíacos (82). Estimular la producción de este factor podría aumentar el número de miofibroblastos y aumentar su capacidad de reparación de la lesión (diana terapéutica).

1.4 LAS PLAQUETAS EN LA REGENERACIÓN TISULAR

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos anucleados y limitados por una membrana, que se forman a partir de fragmentación del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea. Se liberan de forma continua hacia la sangre, y su vida se encuentra alrededor de los 7-12 días. En condiciones normales, su concentración está habitualmente entre 150.000 y 400.000/ μ l y su tamaño medio esta entre 1,5 y 3,5 μ m. Su forma inactiva es discoidea y aplanada.

1.4.1 Funciones plaquetarias

Las plaquetas tienen la capacidad de **producir, almacenar y liberar** multitud de moléculas y proteínas con muy diversas funciones. Su compleja estructura y su riqueza de contenido le proporcionan una gran diversidad funcional. Las principales funciones son:

1. **Hemostasia.** Los componentes del sistema hemostático, incluidas las plaquetas y los factores de coagulación, son necesarios para evitar la pérdida sanguínea y para la curación de las heridas. Después de un daño en un tejido y la afectación vascular, se produce la exposición de proteínas prothrombóticas del tejido intersticial a la sangre, lo que provoca la adhesión y activación plaquetaria. Se inicia el proceso de la coagulación y la protrombina pasa a **trombina**, que transforma el fibrinógeno (soluble) en hebras insolubles de fibrina, y que también actúa como quimio atrayente para los macrófagos, las células madre mesenquimales y las células endoteliales. Las plaquetas se agregan y fusionan sus membranas, liberando progresivamente los gránulos de su interior. Los coágulos ricos en plaquetas y fibrina representan un buen andamiaje para la reparación del tejido (83).
2. **Reparación/Regeneración tisular.** Las plaquetas contribuyen a la curación de las heridas promoviendo la generación de trombina y secretando una amplia gama de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que influyen directamente en el proceso de reparación (84). Hay una reacción inflamatoria y una respuesta inmunitaria iniciales. Se establecen interacciones entre las plaquetas activadas y los leucocitos, que a nivel vascular son positivas para la adherencia y migración de los leucocitos, a través del vaso, hacia la lesión (85).
3. **Mantenimiento de la integridad vascular.** Las plaquetas intervienen en la reparación de los vasos. Gimbrone y colaboradores (86), en el año 1969, demostraron que las glándulas tiroideas que se almacenaban para el trasplante conservaban la integridad vascular (sin alteración del endotelio) al ser perfundidas con PRP en lugar de con plasma pobre en plaquetas. Se ha calculado que aproximadamente el 18% del recambio plaquetario puede atribuirse al mantenimiento de la integridad vascular (87).
4. **Otras funciones plaquetarias asociadas a mecanismos transcripcionales.** A pesar de no contar con núcleo en su interior, y en contra de lo que se creía anteriormente, se ha demostrado que las plaquetas pueden sintetizar factor tisular (factor III de la coagulación) y también IL-1 β , pudiendo asociar procesos como la hemostasia y la inflamación. Disponen de mecanismos únicos para traducir el ARNm en proteínas de forma dependiente de señales extracelulares (88). De este modo, las plaquetas presentan una gran capacidad de adaptarse a las situaciones ambientales, presentando mecanismos post-transcripcionales para dividir, traducir y regular niveles de ARN. Actualmente se encuentra en desarrollo e investigación el área de los microRNAs

(miRNA), que puede aportar nuevas funciones plaquetarias (apartado 1.3.2, sección IV). Zhao y colaboradores, en el año 2019, indican su posible relevancia en la regulación de la miogénesis del músculo esquelético, mediante el estímulo de las células satélite (89). Se ha demostrado su abundancia en las plaquetas, y la liberación de microvesículas (exosomas) con miRNAs a objetivos extracelulares, alterando la expresión génica de esas células (90).

1.4.2 Gránulos plaquetarios: almacenaje y liberación

Las moléculas que transportan las plaquetas se encuentran localizadas principalmente en tres tipos de compartimentos de almacenamiento (91). Se liberan a la circulación o localmente cuando las plaquetas se activan.

1. GRÁNULOS α (50-80/plaqueta). Son los más abundantes y muy heterogéneos.
 - a) Proteínas de adhesión.
 - b) Factores de coagulación.
 - c) Inmunoglobulinas
 - d) Citoquinas.
 - e) Factores de crecimiento.
2. GRÁNULOS DENSOS (3-8/plaqueta). Principal fuente de moléculas pequeñas. Nucleótidos, como adenosin difosfato o trifosfato (ATP, ADP), que facilitan la adhesión plaquetaria y la vasoconstricción. Neurotransmisores, como la serotonina.
3. LISOSOMAS. Contienen importantes enzimas hidrolíticas ácidos, como la elastasa o la colagenasa. Su función principal es la degradación del coágulo en fases avanzadas de la reparación tisular.

Se desconoce con exactitud cómo se organizan los orgánulos secretores que favorecen la liberación del secretoma y cuáles son las rutas clave, y las investigaciones sobre la secuencia de liberación a lo largo del tiempo aún son insuficientes.

Además, se siguen descubriendo nuevas moléculas que son almacenadas, transportadas y liberadas por las plaquetas. Un ejemplo es la tirosin quinasa VLK, en los gránulos α , tal y como destacaron Bordoloni y colaboradores en el año 2014 (92). Su liberación justifica la amplia fosforilación de tirosina de las proteínas extracelulares, que era un misterio, al no existir previamente una proteína tirosina quinasa secretada conocida (93). En la misma línea, se observaban azúcares extracelulares modificados formando parte de la composición de proteínas de la circulación, sin fuente evidente de esos nucleótidos o de glucosiltransferasas. Se ha observado que la plaqueta es fuente de ambos: nucleótidos de azúcar extracelular (94) y glucosiltransferasas (95).

También ha ganado relevancia en los últimos años el estudio de **los exosomas y las microvesículas**. Los exosomas son vesículas derivadas de los endosomas (invaginaciones previas de la membrana), con tamaño entre 40 y 100 nm, y las microvesículas son gemaciones de la membrana plasmática con un tamaño menor a 1000 nm (67). Representan un reservorio de moléculas. Los exosomas contienen proteínas transmembrana, lípidos, mRNA, microRNA (89) y también factores de crecimiento. Todo ello indica que pueden tener un papel relevante en las acciones de las plaquetas (96).

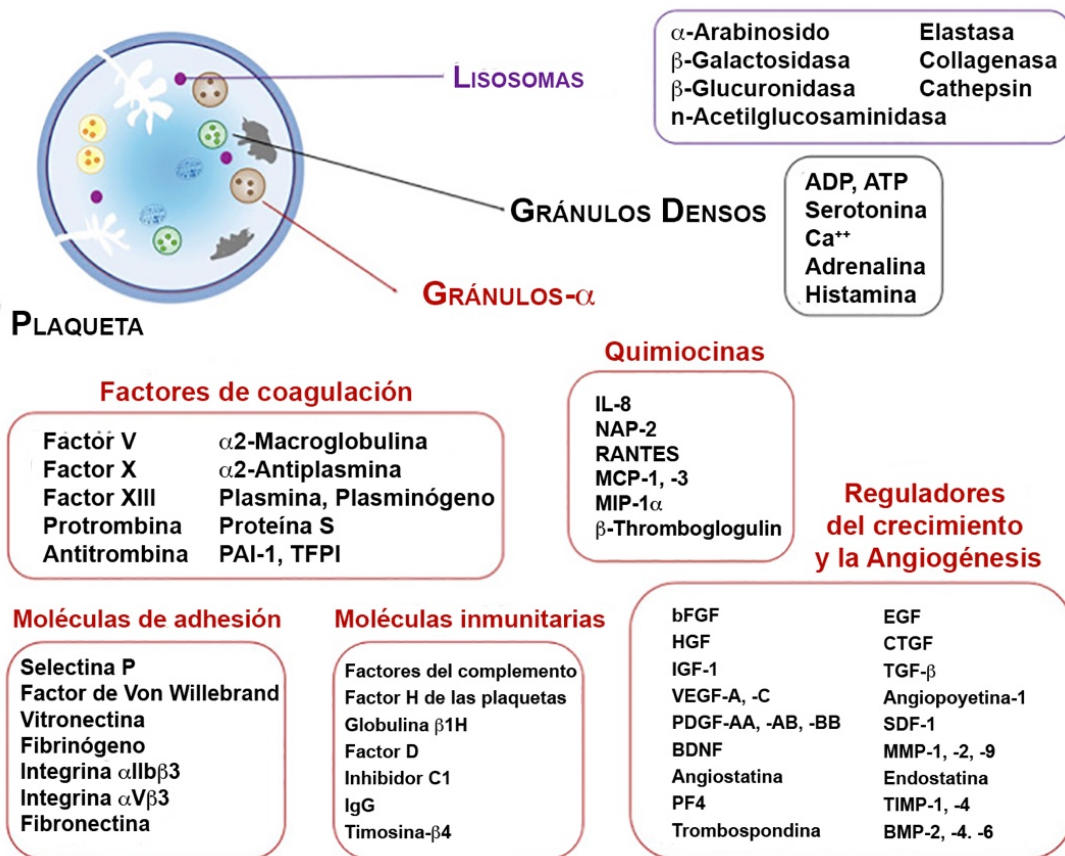


Figura 16 - Contenido plaquetario.
Fuente: Burnouf, 2016 (97).

I. Almacenaje molecular en los gránulos

La distribución de las moléculas dentro de los gránulos alfa se ha estudiado en plaquetas en reposo mediante inmunofluorescencia de alta resolución, y se ha observado que está espacialmente segregada, pero aparentemente sin selectividad temática (98, 99). En cambio, otros autores si observan un almacenaje temático en distintos gránulos para proteínas pro y anti angiogénicas (100, 101), lo que puede implicar una secreción determinada según su función.

Además, se ha observado que las plaquetas circulantes pueden **modificar su composición**. Son capaces de secuestrar hacia su interior proteínas reguladoras de la angiogénesis (101), o factores de crecimiento presentes en el plasma, como IGF-1 (102). Esto conduce hacia una interesante cuestión: ¿existen modificaciones importantes del contenido plaquetario tras una lesión aguda? En el caso de la utilización del PRP, podría existir un momento óptimo para la extracción y obtención de plaquetas tras producirse una lesión. Hay que tener en cuenta que el músculo esquelético tienen capacidad de secreción de moléculas a la circulación (mioquinas), en respuesta a distintos estímulos ambientales o fisiológicos, y estas moléculas pueden influir en el propio proceso de miogénesis o modular la homeostasis de otros tejidos (103).

II. Secreción del secretoma plaquetario

Es necesario progresar en el conocimiento y caracterización de los **mecanismos de liberación** de las plaquetas para definir los criterios que controlan la degranulación y la secreción de moléculas que promueven o contrarrestan las respuestas adhesivas e inflamatorias (104). En la fusión de las membranas intervienen factores como las fuerzas de cizallamiento, y distintos subconjuntos de proteínas de membrana SNARE (Receptores de proteína de fijación soluble a la N-etilmaleimida).

Las necesidades del tejido cambian, siguiendo una secuencia temporal. Heijnen, en su artículo del 2015 (104), plantea dos interesantes cuestiones en relación con la heterogeneidad de funciones de los componentes de los gránulos: ¿existe algún mecanismo para regular el almacenaje de las moléculas según su función?, y ¿hay una cinética de liberación diferente para proteínas con funciones diferentes? Algunas posibles respuestas las aportó Schär en el año 2015, indicando que puede existir una **liberación temática**, en base a la función de las moléculas (ejemplo: mediadores adhesivos frente a inflamatorios) (105) y una **cinética de secreción** específica para distintos subtipos de gránulos α . Por lo tanto, puede existir una liberación del contenido plaquetario diferenciada por el producto y en el tiempo.

A. **Secreción diferenciada**

Mediante métodos de criofijación se ha demostrado que los gránulos α y los densos forman poros de fusión transitorios con la membrana plasmática, pudiendo liberar moléculas pequeñas (106), mientras que las proteínas más grandes son retenidas. Es posible que distintas vías de señalización contribuyan a una liberación diferenciada en ambos tipos de gránulos.

Dada la gran diversidad que existe en la composición de los gránulos, pueden encontrarse juntas moléculas con funciones antagonistas, por lo que, en teoría, debería producirse una liberación diferenciada. Un mecanismo puede ser la activación selectiva de receptores de trombina PAR-1 y PAR-4, que ha sido descrita como una vía para la liberación de factores pro o anti angiogénicos (107). También es posible que la liberación diferenciada sea función de una activación parcial de las plaquetas. En el lugar del daño vascular, se produce un trombo cuya composición y estructura

son dinámicos, y el grado de activación de las plaquetas podría estar estratificado. En consecuencia, la liberación de gránulos podría variar tanto espacial como temporalmente (99).

B. Cinética de liberación.

La velocidad de liberación ha de ser muy rápida para los factores adhesivos-coagulantes y para el reclutamiento de células inflamatorias, pero podría ser más lenta para moléculas implicadas en fases más avanzadas en el proceso de regeneración del tejido, como la diferenciación de los mioblastos, la fusión de los miocitos en fibras, el depósito y remodelado de colágeno o el aumento del tamaño de las fibras

Jonnalagadda y colaboradores, en el 2012, estimularon las plaquetas con diferentes agonistas (trombina, agonista PAR1, agonista PAR4 y convulxina) y cuantificaron la liberación de 28 moléculas a lo largo del tiempo, relacionando la potencia del agonista con su dosis y la velocidad y alcance de la liberación (99). La **trombina** provocó rápidamente la mayor liberación de moléculas. Encontraron distintas proporciones de moléculas secretadas a lo largo del tiempo, distinguiendo tres picos de liberación. Los autores consideraron que la liberación de plaquetas se describe mejor como la suma de al menos **3 clases de procesos de liberación** que difieren en velocidad, pero la distribución de la carga en cada clase pudo ser aleatoria. Únicamente la serotonina (gránulos densos), estaba de manera constante elevada solo en esa primera fase. Los autores describen la secreción plaquetaria como un proceso estocástico (sistema compuesto por factores tanto predecibles como aleatorios), y potencialmente controlado por factores como la solubilidad de la carga, la forma de los gránulos y/o los mecanismos de fusión de los gránulos con la membrana plasmática.

La estructura y composición del coágulo que se forma también puede condicionar la cinética de secreción plaquetaria. En el artículo ya citado de Schärd (105), se observó in vitro la liberación de varios factores de crecimiento, durante 28 días, en distintas preparaciones: PRP leuco enriquecido (L-PRP), Fibrina Rica en Plaquetas leuco enriquecida (L-PRF) y un coágulo de la sangre. En cuanto a la cantidad de factor liberado por cada concentrado, no se observaron diferencias en el IGF-1 y PDGF-AB. Se liberó más **TGF- β 1** en el L-PRF y en L-PRP respecto al coágulo (10 y 7 veces más, aproximadamente), mientras que a partir del coágulo sanguíneo se observó una mayor liberación de VEGF (entre 2 y 3 veces más, frente a L-PRF y L-PRP). En cuanto al momento de mayor concentración de cada molécula, los autores observaron una **cinética de liberación específica** para la mayoría de los factores de crecimiento en los tres concentrados (Tabla 1), con algunas diferencias entre ellos:

1. En todos los concentrados, la mayor cantidad de **VEGF** se observó entre las 72 horas y los 7 días. En el L-PRP también se observó altas cantidades a las 8 horas, que descienden para luego aumentar (liberación concentrada en 2 picos).

2. La liberación principal de **IL-1 β** ocurrió a las 24 horas (coagulo sanguíneo y L-PRF) y a las 72 horas (L-PRP).

3. El **IGF-1** y el **PDGF-AB** estaban presentes en altas concentraciones a las 8 horas, en el L-PRP y en el coagulo sanguíneo, mientras que su liberación fue más baja y sostenida en el L-PRF, durante 72 horas.

4. La concentración de TGF- β 1 tuvo dos picos bien diferenciados en el L-PRP, a las 8 horas y a los 7 días, y en el coagulo sanguíneo, a las 8 horas y a los 14 días. Mientras que en el L-PRF tuvo un aumento progresivo con un único pico a los 14 días.

Los autores indicaron que para conocer la relevancia de estos resultados son necesarias nuevas investigaciones donde el factor tiempo sea tenido en consideración, para valorar el efecto de los concentrados plaquetarios sobre los tejidos lesionado.

En conjunto, los resultados sobre el tipo de secreción de los gránulos y la cinética de liberación evidencian un proceso dinámico y complejo, muy distinto de un “todo o nada”, con **diferentes momentos de mayor liberación de moléculas**. La cinética de liberación de factores de crecimiento puede tener una gran relevancia en la regeneración del tejido. En base a los estudios mencionados, parece lógico pensar que una liberación específica de moléculas en el momento adecuado, según la fase de curación del tejido, puede favorecer la regeneración del tejido.

1.4.3 Adhesión, coagulación y defensa

En condiciones normales, las plaquetas se encuentran en el torrente sanguíneo en su forma inactiva. Se activan al unirse a componentes, como el factor von Willebrand (VWF) o el colágeno, que se exponen en la lesión vascular. Se activan varias vías de señalización que aumentan el calcio en el interior de la plaqueta, promoviendo la fusión de los gránulos con la membrana plasmática y la liberación de su contenido.

Las glicoproteínas adhesivas son necesarias para la hemostasia primaria. Permiten a las plaquetas adherirse a la zona dañada como paso previo a la formación de un trombo estable. Las principales proteínas adhesivas son el **VWF** y la **fibronectina** (unión al vaso dañado), el **fibrinógeno** (soluble; pasa a fibrina mediante la acción de la trombina), la vitronectina, y la trombospondina (acción anti-angiogénica).

En relación con los factores de coagulación, algunos ejemplos relevantes son el Factor V, la Proteína S y el Factor XI. Y también es muy relevante la función inmuno-moduladora asociada a las plaquetas. Existen inmunoglobulinas dentro del secretoma plaquetario, lo que le transfiere capacidad defensiva frente a patógenos como bacterias u hongos. Esta acción moduladora de la respuesta inmune se pone igualmente de relevancia con la secreción de multitud de citoquinas y factores de crecimiento.

1.4.4 Citoquinas

Aunque la importancia de los PRPs se ha focalizado durante años en los factores de crecimiento, los PRPs vehiculizan multitud de proteínas, entre las que se encuentran las citoquinas. Son pequeñas proteínas solubles que regulan la respuesta inmune, modificando la actividad de un gran número de tipos celulares. Se emplea como sinónimo el término citocinas, y pueden distinguirse diferentes subpoblaciones, como las quimioquinas (movilizan células inmunitarias) o las interleuquinas (comunicación entre leucocitos). También pueden clasificarse por familias: **Interleuquina I, hematopoyetina, Interferón, Factor de Necrosis Tumoral, Interleucina-17 y quimioquinas.**

Sus acciones generales son: cambios en la expresión de moléculas de adhesión celular (movimiento), regulación de la actividad enzimática y regulación de la activación, proliferación y diferenciación de algunas células, como los LT. El mecanismo de acción es la unión a receptores específicos de membrana en las células, activando vías intracelulares de señalización (108). Con respecto a las células diana, estas acciones pueden ser endocrinas (a distancia de la célula secretora), paracrinas (cercanas) o autocrinas (sobre la propia célula secretora). Por lo tanto, se establece una red de conexión entre distintos tipos celulares: comunicación intercelular, principalmente como señalización paracrina.

Su función principal es **modular la respuesta inmune** ante una agresión, mediante acciones pro y anti inflamatorias. Son liberadas por las plaquetas ante la lesión del tejido. Y también son producidas por macrófagos activados, linfocitos, y otras células como leucocitos neutrófilos, células endoteliales, adipocitos o miocitos.

La alta capacidad regulatoria de las citoquinas viene determinada por sus múltiples efectos biológicos: pleiotropía (diferentes efectos en función de la célula diana), redundancia (dos o más citoquinas provocan efectos similares), sinergismo (la acción combinada de dos citocinas potencian el efecto provocado), antagonismo (inhibición o acción opuesta), efecto cascada (la célula diana produce una o más citocinas adicionales).

La proteína más abundante en las plaquetas es la citoquina **Factor 4 plaquetario (PF4 o CXCL4)**. Se une a glicosaminoglicanos e interviene en la hemostasia/trombosis y en la atracción de monocitos y neutrófilos. También tiene acción angiostática, es decir, produce un efecto negativo sobre la angiogénesis. El mecanismo angiostático es a través de la inhibición de los factores de crecimiento VEGF y bFGF (109).

Otras citoquinas con una importante acción moduladora de la respuesta inflamatoria y muy abundantes en los PRPs son:

- **RANTES o CCL5.** Actúa sobre diferentes células que expresan receptores transmembrana de tipo CCR1, CCR3 y CCR5. Estos receptores están presentes en linfocitos Th1, monocitos/macrófagos, células dendríticas, basófilos y eosinófilos, por lo que la CCL5 puede

inducir su activación, polarización, proliferación y quimiotaxis (110). La administración de CCL5 recombinante en un modelo con ratones knock out para la señalización del complemento C3a restauraba la reparación muscular a través del reclutamiento de macrófagos y la proliferación de mioblastos, lo que indicó la relevancia de esta citoquina en el proceso de regeneración muscular (111).

- **Proteína quimio atrayente de monocitos MPC-1 o CCL2.** Es producida por diversos tipos celulares, ya sea de forma constitutiva o tras su inducción, por otras citoquinas o por factores de crecimiento. Tiene una gran capacidad de reclutar monocitos, linfocitos T memoria y células Natural Killer, participando en la regeneración muscular (108).

1.4.5 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas de bajo peso molecular y solubles, y son esenciales para la reparación y regeneración del tejido lesionado. Actúan coordinadamente en la señalización celular que tiene lugar en las distintas fases de la reparación tisular, interaccionando con receptores específicos situados en la membrana celular. Pueden activar la mitosis, estimular la angiogénesis, la síntesis de matriz extracelular o la remodelación del tejido. En base a estas múltiples funciones, a lo largo de los últimos 20 años se ha propuesto la aplicación de distintos concentrados de plaquetas en diversas patologías, como las lesiones tendinosas y las musculares en el ámbito de la Traumatología y de la Medicina del Deporte (112). Existen multitud de factores de crecimiento. Algunos serán comentados a continuación por su importancia y cantidad, como el PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-1. Existen muchos otros ejemplos, como el factor de crecimiento epidérmico **EGF** (regula la inflamación y los fibroblastos, y estimula el crecimiento de células epiteliales para la reparación de tejido), el factor de crecimiento de fibroblastos **bFGF** (proliferación de células precursoras, como el condroblasto o el osteoblasto, para formar tejido fibroso), y el factor neurotrófico derivado del cerebro **BDNF** (crecimiento y diferenciación de poblaciones neuronales).

Mecanismo de acción y función.

Los factores de crecimiento se unen a receptores de membrana específicos en distintos tipos de células, activando vías de señalización intracelulares.

En cada una de las fases de la regeneración muscular descritas, una señalización específica se activa, se silencia o se equilibra con otras señales endógenas que sirven para limitar la duración de cada etapa, y hacer que el tejido evolucione a la etapa siguiente de la reparación. Durante estas etapas, las células locales y las infiltradas sintetizan distintas proporciones y distintos tipos de factores, en un intento por atender las demandas del músculo en fase de reparación.

Consecuentemente, las estrategias terapéuticas para manipular la reparación tisular necesitan integrar múltiples fenotipos celulares y distintos circuitos de señalización molecular, para que haya una comunicación dinámica entre las células. La necesidad de modificar distintas vías

moleculares simultáneamente demanda el suministro de una **combinación de moléculas mediadoras**, en vez de la administración de una sola proteína purificada que no podría abastecer las múltiples demandas del tejido lesionado (113). Por tanto, la capacidad de proporcionar **señales celulares apropiadas en el momento adecuado** para suplir las necesidades del tejido es una de las premisas que sustenta la aplicación de PRP.

A continuación, se destacan algunos factores de crecimiento que tienen un papel importante en la regeneración muscular

1. Factor de crecimiento derivado de las plaquetas PDGF.

Actúa principalmente en las primeras fases de la curación. En fase tardía puede influir en la remodelación.

- Activación, migración y proliferación de células inflamatorias como los macrófagos (M1) y los fibroblastos.
- Angiogénesis. El PDGF-BB es secretado por el endotelio activado de los nuevos vasos, estimulando el reclutamiento de pericitos, que se asocian para la maduración de los vasos.
- Síntesis de otros factores de crecimiento, como el IGF-1.

Gianni-Barrera, en el año 2020, destaca la importancia de dos factores críticos para que el PDGF pueda realizar sus funciones: la interacción con la MEC y la formación de un gradiente de concentración (114).

Es necesaria una presencia simultánea y en equilibrio entre el VEGF y el PDGF-BB. In vitro, se ha observado que concentraciones patológicas de VEGF pueden dar lugar a angiogénesis aberrante, mientras que la presencia simultánea de PDGF-BB puede limitar esa proliferación descontrolada de células endoteliales (115).

Además, para continuar con el proceso de angiogénesis, es necesario el contacto entre las células endoteliales y los pericitos, quienes producen señales paracrinas que regulan la función endotelial. Los principales mediadores de estas interacciones moleculares son el TGF- β 1, las angiopoyetinas-1 y -2 (Ang-1 y Ang-2) y la efrinaB2/EphB4 (116).

2. Factor de crecimiento transformante TGF- β 1.

Es una proteína que se sintetiza por múltiples células, como los macrófagos, los linfocitos, las células endoteliales y los megacariocitos. En el músculo, es muy relevante su secreción por parte de los LT reguladores. Es liberada en su forma inactiva, y es necesaria su escisión proteolítica para generar la proteína activa. La activación se produce a partir de complejos latentes que se presentan en la superficie de las células inmunitarias o en la matriz extracelular. Con la disolución del coagulo sanguíneo, se produce la proteólisis del plasminógeno y su paso a **plasmina**, que activa el TGF- β . La forma activa se une a receptores celulares (tipo I y II), que

tienen actividad serina-treonina quinasa, produciendo la fosforilación de factores citoplasmáticos llamados Smads. Los Smads fosforilados entran en el núcleo de la célula, se asocian a proteínas de unión al ADN y activan o inhiben la transcripción de determinados genes (117). Los efectos posibles son múltiples, dependiendo del tipo de célula que estimula y del entorno (efecto pleiotrópico). Tras un daño tisular agudo, en fase iniciales puede regular la proliferación de distintas células (118), junto a otros procesos como la diferenciación o la apoptosis. La acción predominante es antiinflamatoria, al provocar la supresión del sistema inmune. En algunos artículos se han obtenido mejores resultados en la regeneración tisular con concentraciones bajas (119, 120), pero es una cuestión en debate. En el músculo, puede estimular el paso de células progenitoras fibroadipogénicas a fibroblastos, lo que implica una regulación en el depósito de colágeno (aumento de su síntesis y depósito). También puede disminuir la actividad de proteasas de la matriz extracelular, disminuyendo la degradación del colágeno.

A nivel vascular, el TGF- β puede promover funciones opuestas en la regulación del endotelio y de los pericitos. La activación de Alk1-SMAD1/5 estimula la **proliferación y la migración de las células endoteliales**, así como la transición de endotelial a mesenquimal. En cambio, la activación de Alk5-SMAD2/3 promueve específicamente la **estabilización vascular** induciendo la quiescencia endotelial y la producción de proteínas de la matriz extracelular y de la membrana basal (121).

3. Factor de crecimiento vascular endotelial VEGF.

Es el principal regulador del crecimiento vascular, tanto en el desarrollo embrionario como en la reparación de tejidos. Actúa de forma selectiva sobre las células endoteliales, con una potente acción mitógena (122). También induce la síntesis y liberación de metaloproteasas por parte de las células endoteliales, lo que les permite la degradación de la membrana basal, y la síntesis de integrinas para su presentación en la superficie celular. Ambos procesos facilitan la migración de las células endoteliales.

El VEGF pone en marcha la compleja cascada de acontecimientos celulares y moleculares que conducen al ensamblaje ordenado de las nuevas estructuras endoteliales (morfogénesis) (123), su asociación con las células murales/pericitos (maduración) y su posterior capacidad de persistir indefinidamente en ausencia del factor de crecimiento (estabilización). Se forman redes vasculares plenamente funcionales (114).

Es posible diferenciar distintas etapas durante la angiogénesis inducida por el VEGF en el músculo esquelético: en una etapa inicial, hay aumento del tamaño circunferencial de los nuevos vasos, durante los primeros 4 días. Posteriormente hay un desdoblamiento longitudinal (invaginación) que se completa alrededor del 7º día (124). Estos cambios en la angiogénesis coinciden con cambios observados en la cinética de liberación de VEGF en un concentrado de

PRP rico en leucocitos (L-PRP), en el estudio citado de Schärd (105), donde existe una fase meseta de concentración del factor VEGF entre el tercer y séptimo día.

Para la persistencia a largo plazo de los vasos, se ha comprobado con distintos métodos que la expresión de VEGF en el microambiente es necesaria durante al menos 4 semanas (125, 126). En caso contrario, los nuevos vasos son inestables, y retroceden rápidamente tras el cese del estímulo. También se observó que los vasos inducidos por niveles más bajos de VEGF se estabilizan más rápidamente, sin afectarse el reclutamiento de pericitos, que parece ser dependiente de PDGF (114). Esto datos de Gianni-Barrera coinciden con los resultados del artículo de Schärd, donde se observaron dosis bajas y mantenidas de VEGF entre los días 14 y 28, de un concentrado plaquetario del tipo L-PRP (Tabla 1).

4. Factor de crecimiento insulínico IGF-1.

Es un factor de crecimiento que se produce principalmente en el hígado, estimulado por la hormona de crecimiento. Viaja en el torrente sanguíneo asociado con proteínas de unión: "IGF Binding Proteins" (IGFBPs). Sus efectos comienzan al separarse de la proteína de unión y unirse a sus receptores específicos, que se encuentran en células de muy diversos tejidos.

Entre sus efectos destacan la proliferación celular, la neurogénesis y la inhibición de la apoptosis celular. Además, puede actuar de manera positiva en diferentes etapas de la miogénesis, como en la proliferación de células satélite y, posteriormente, en el crecimiento de miofibras.

En un estudio en ratones, se demostró una expresión de IGF-1 marcadamente aumentada en los macrófagos del músculo lesionado, por lo que es posible asociar un papel fundamental en la regeneración muscular tanto a los macrófagos como a la IGF-1. El reclutamiento de los monocitos y los macrófagos, desde la medula ósea a la sangre y desde la sangre al músculo lesionado, fue promovido mediante la señalización del receptor de quimiocinas CCR2, lo que no ocurrió con las poblaciones de linfocitos o neutrófilos (127).

Este importante papel en la miogénesis también ha sido descrito en otros interesantes modelos con ratones, donde se provocó una lesión muscular en los músculos gastrocnemios y se aplicó un protocolo de tres infiltraciones los días 1, 3 y 5 de distintos factores de crecimiento específicos (b-FGF, IGF-1 y NGF) en distintos grupos de ratones (128, 129). Menetrey y colaboradores midieron histológicamente la regeneración muscular en algunos de los ratones transcurrida una semana, analizando el número de miofibras en el músculo infiltrado y en el contralateral, considerando las miofibras con núcleo centralizado como las regeneradas o de nueva síntesis. También fue medido el diámetro de las miofibras. Al mes, también se realizó una valoración histológica de cada grupo, así como una valoración de las propiedades contráctiles. Los resultados mostraron que la infiltración con IGF-1 y b-FGF mejoraron la regeneración muscular en vivo en comparación con el músculo control, junto con un aumento significativo de la fuerza de contracción rápida y tetánica (129).

La naturaleza dinámica, en espacio y tiempo, de los mecanismos de reparación representa un reto a la hora de identificar cuáles son los mecanismos críticos en la regeneración muscular.

Tabla 1 - Liberación y acciones de distintos factores de crecimiento en el laboratorio.

Adaptación de los artículos de Schaer 2015 (*): liberación de factores en un concentrado de LR-PRP en las primeras 8-24-72 horas y 14-28 días (105); y de Kobayashi 2016 (**): liberación de factores en un concentrado de PRP en las primeras horas 1-8-24-72 horas y 10 días (130).

	ACCIONES EN EL MÚSCULO	MOMENTOS de elevada concentración	MECANISMOS
PDGF	Migración y proliferación de células inflamatorias y fibroblastos y células endoteliales. Estimula la síntesis de fibronectina.	- Primeras 8 horas ** - (Leve aumento a las 72 h) *	Activación del gen CCL2 en múltiples tipos de células.
TGF-β	Efectos pleiotrópicos, en función de la célula y el microambiente. Regulación del crecimiento celular Activación de células FAP Fibrosis. Acción antiinflamatoria	- Primeras 8 horas ** Repartido en 2 fases: - Primeras horas. - Fase meseta, entre 72 h- 7 días*	Estimulo de receptores con actividad serina-treonina kinasa, con fosforilación de factores Smads, y síntesis posterior de ADN
VEGF	Angiogénesis: migración y proliferación de las células endoteliales.	- 1ª hora – 10 días ** Repartido en 2 fases: - Primeras horas. - Fase meseta, entre 72 h- 7 días*	Activación del receptor VEGFR-2 Señalización Dll4/Notch1
IGF-1	Proliferación celular. Inhibición de la apoptosis. Neurogénesis. Hipertrofia muscular.	- 1ª hora – 10 días **	Eje Hormona de crecimiento (GH)/IGF-1. Activación del Receptor IGF-1. Acción regulada por las IGFbps.

1.5 CLASIFICACIONES DE LOS PRP

1.5.1 Terminología

Se emplea el término “**Plasma Rico en Plaquetas**” de manera genérica, en referencia a un concentrado plaquetario con capacidad para estimular la reparación y regeneración del tejido. En realidad, este término engloba distintos productos biológicos con grandes diferencias en su composición. Además, los resultados clínicos de su aplicación dependen de factores como las características propias de la sangre del paciente y del tipo de tejido lesionado, y las interacciones celulares en un microambiente con daño agudo o crónico (131). Todo ello implica una complejidad elevada en la evaluación de resultados, que se puede minimizar con dos aspectos fundamentales:

- **la descripción o caracterización del producto infiltrado**, en relación a su obtención, composición y aplicación.
- **el registro y análisis de la evolución** de cada paciente.

Al tratarse de distintos tipos de productos y al no existir una clara superioridad de un tipo concreto sobre el resto, no existe una estandarización de la preparación para conseguir un PRP de referencia. En consecuencia, tampoco se ha conseguido un sistema de clasificación consensuado, y han ido apareciendo diferentes terminologías y abreviaciones (Tabla 2).

Tabla 2 - Principales términos relacionados con los concentrados plaquetarios.

En base a los artículos de Kon 2020 (132), Dohan-Ehrenfest 2009-2012 (133, 134) y Everts 2020 (131).

TÉRMINO	ABREVIATURA (del inglés)	CARACTERÍSTICAS
Plasma Rico en Plaquetas	PRP	Término genérico, en relación con un concentrado plaquetario con capacidad para estimular o mejorar el proceso de reparación/regeneración de un tejido
Plasma Rico en Plaquetas - Puro	P-PRP	PRP con ausencia de glóbulos rojos ($<10^6/\mu\text{L}$) y con una cantidad de leucocitos neutrófilos mínima o nula (menos de la línea basal en sangre) (132).
Plasma Rico en Plaquetas - Pobre en Leucocitos	LP-PRP	PRP con concentración baja de leucocitos, en relación con la línea basal en sangre. Solución inyectable, que tras su activación pasa a gel de fibrina (133).
Plasma Rico en Plaquetas - Rico en Leucocitos	LR-PRP	PRP con elevada concentración leucocitaria (neutrófilos) respecto a la concentración sanguínea. Solución inyectable, también en forma líquida o gel de fibrina (133).
Fibrina Rica en Plaquetas - Pura	P-PRF	La fibrina es un biomaterial sólido, puro en ausencia de glóbulos rojos y leucocitos (o presencia mínima). Se obtiene por centrifugación sin anticoagulante y sin activadores externos, dando lugar a una estructura de fibrina fuerte (134).
Plasma Condicionado Autólogo (o Suero autólogo condicionado)	ACP (o ACS)	Plasma autólogo extraído y expuesto a agentes externos, como pequeñas perlas de cristal, para conseguir la producción y secreción de proteínas anti-inflamatorias.
Plasma Rico en Factores de Crecimiento	PRGF	Concepto genérico e impreciso en términos de regeneración tisular, ya que en el plasma hay muchas otras sustancias relevantes.
PRP-Clínico efectivo	C-PRP	PRP con características adecuadas para producir resultados clínicos significativos. Depende del tejido, de la dosis de plaquetas, ausencia o mínima presencia de glóbulos rojos, y de la concentración o eliminación de leucocitos (131).

1.5.2 Clasificaciones. Caracterización del PRP

Se han establecido distintas clasificaciones de los concentrados plaquetarios en los últimos 15 años, en base a características como el método de obtención, el contenido celular del producto o su estado físico en el momento de la aplicación. Ninguna de ellas ha llegado a establecerse como referencia, probablemente porque no existe una definición clara de lo que significa la **caracterización o descripción del PRP**.

En un breve resumen de las principales clasificaciones, destaca la presentada por Dohan-Ehrenfest en el año 2009 (133). Agrupa los concentrados plaquetarios en 4 grupos, en función del contenido de leucocitos y la estructura de fibrina: Plasma Rico en Plaquetas y pobre en Leucocitos (Pure-PRP), Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos (L-PRP), Fibrina Rica en Plaquetas y Pobre en Leucocitos (Pure-PRF), Fibrina Rica en Plaquetas y Rica en Leucocitos (L-PRF).

En el año 2012 aparecen los trabajos de DeLong (135) y de Mishra (136). Ambos hacen referencia a la importancia del número absoluto de plaquetas, la activación o no plaquetaria, y la presencia o no de glóbulos blancos (neutrófilos).

En el año 2015, Mautner insiste en la importancia de un sistema de clasificación estandarizado (137), destacando las características del PRP que pueden influir en su actividad y eficacia, como la concentración de plaquetas, de leucocitos, de eritrocitos y la activación o no por agentes exógenos (clasificación PLRA). Y en la misma línea, Magalon publicó una clasificación en el año 2016, la clasificación DEPA (138), que se basa en la dosis de plaquetas inyectadas, eficiencia de la producción, pureza del PRP y la activación del PRP. En el 2017, Santos-Duarte (139) introduce la clasificación MARSPILL, donde incluye el registro del sistema de centrifugación y el de activación. También se propone otra clasificación en el 2020, desde la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia, con recomendaciones consensuadas sobre el uso de productos plaquetarios en medicina regenerativa.

Caracterización del PRP: descripción de su obtención, composición y aplicación

En el año 2020, tanto los trabajos de Everst (131) como de Kon y colaboradores (132), insisten en la importancia de los numerosos factores a tener en cuenta para clasificar o caracterizar un PRP. Everst indicó numerosos parámetros, como la tecnología empleada (centrifugación, recuperadores-separadores sanguíneos, plasmaféresis) o la presencia o no de aditivos en el PRP (como productos autólogos o fármacos). Kon indica un resumen de las numerosas características del PRP a reflejar en los estudios in vitro, en animales o en ensayos clínicos. En ambos enfoques se destaca la complejidad de la clasificación de un producto biológico. Esto, junto al hecho de que ninguna de las clasificaciones previas ha conseguido llegar a establecerse como referencia, indica que se necesita una **descripción completa** de distintos apartados relacionados con el producto biológico empleado: **obtención, composición y aplicación**.

Kon y colaboradores, en una publicación del 2020, proponen una clasificación basada en describir los aspectos relacionado con la obtención del producto, el análisis celular y el protocolo de aplicación. Además, proponen un sistema de codificación del PRP, lo que representa un nuevo avance, al informar sobre la composición del producto de una manera rápida, sencilla y fácilmente comparable.

En definitiva, independientemente de la clasificación empleada, lo fundamental es que exista siempre una **descripción global del PRP empleado**.

1.5.3 Obtención de los PRPs

Existen dos métodos principales, que se presentan a continuación:

I. Métodos para la obtención del PRP

Separación por centrifugación. Es el más empleado y antiguo. Generalmente se realiza mediante dispositivos mecánicos, con técnicas de **centrifugado único o múltiple**. Al centrifugar la sangre, las células sanguíneas se separan en base a su **densidad**. Esto permite separar el componente plaquetario, con menor densidad, de los eritrocitos. Los leucocitos, con una densidad intermedia, quedan en una capa intermedia (“buffy coat”). Las diferencias en la fuerza G empleada y el tiempo de centrifugación provocan diferencias en la composición del producto y en el estado de activación de las plaquetas aisladas.

La anticoagulación sanguínea suele hacerse con citrato sódico, citrato dextrosa o ácido EtilenDiaminoTetraAcético (EDTA). Es relevante registrar la proporción empleada de anticoagulante-sangre (ejemplo: 1 ml de citrato sódico por cada 9 ml de sangre), para que no se produzca la coagulación del producto y para tener en cuenta la posible dilución de la sangre.

Existen multitud de dispositivos comerciales desarrollados para la preparación de PRP por centrifugación, lo que da lugar a variaciones en la composición final del producto obtenido (140).

Separación estándar de células sanguíneas. Se emplean separadores y tecnología de flujo continuo por donde circula la sangre, junto con pasos o fases de centrifugación. Son empleados en algunos procesos de manera intra-operatoria.



Figura 17 - Densidad de los distintos componentes celulares sanguíneos.
Fuente: Everst 2020.

II. Dispositivos para la obtención de PRP.

Algunos dispositivos son sistemas cerrados, en los que en todo momento la sangre o el PRP se encuentra contenido en recipientes, mientras que otros son abiertos y precisan de un pipeteado para la obtención del producto. También se distinguen dispositivos que consiguen una buena separación por densidades de los distintos tipos de células sanguíneas, mientras que otros mezclan las plaquetas con los leucocitos, o no consiguen evitar la totalidad de los eritrocitos. Es positivo que se consigan separar bien las células en distintos niveles o fases celulares, porque permite la opción de incluir o no la parte con leucocitos.

En un interesante trabajo de Fadadu, en el 2019 (140), se analizan 33 sistemas y protocolos de obtención de PRP. Se encontraron grandes diferencias en los protocolos y en el rendimiento de los sistemas en la obtención de plaquetas, desde valores por debajo de la concentración sanguínea, hasta una concentración de $1,6 \times 10^6$ plaquetas/ μl . Encontraron una correlación positiva entre el volumen de sangre recogido y la fuerza centrífuga del dispositivo, y la concentración de plaquetas obtenida. Consideran en las conclusiones que debe resolverse la gran heterogeneidad entre los sistemas para poder comparar los resultados.

En otro estudio previo de Magalon (2014) (141), se comparó el PRP obtenido empleando 4 dispositivos y un protocolo propio desarrollado en el laboratorio. Se empleó un modelo con diez personas donantes de las muestras sanguíneas, y por cada donante se obtuvo una preparación de PRP con cada uno de los dispositivos y con el protocolo propio. Se evaluaron las concentraciones de plaquetas, glóbulos blancos y eritrocitos, el estado de activación de las plaquetas, y varios factores de crecimiento (VEGF, PDGF-AB, EGF, TGF- β 1). Se encontró una correlación positiva entre las dosis de plaquetas y todos los factores de crecimiento estudiados. Por otro lado, observaron diferencias importantes entre las composiciones celulares de los distintos PRP obtenidos, y consideraron que podrían suponer resultados diferentes en el tejido tratado, como una posible causa de la variabilidad observada entre los resultados de las publicaciones científicas.

1.5.4 Composición y activación del PRP

Para determinar la composición del PRP, Kon y colaboradores proponen un **sistema de codificación** (132). Esto implica una descripción detallada de la **formulación del producto y de su activación**. Distinguen 6 principales apartados (niveles o números), y asignan unos posibles valores a cada uno.

Una interesante utilidad de este sistema es que se pueden añadir otros aspectos de la composición del PRP y codificarlo, en función de la relevancia que puedan llegar a adquirir. Un ejemplo podría ser el uso de PRP combinado con otros productos.

Tabla 3 - Codificación del PRP.

Composición celular y tipo de activación plaquetaria. Fuente: Kon, 2020.

APARTADOS	CARACTERÍSTICAS
N1	Concentración Basal de plaquetas en la sangre. Ejemplo: valores entre 200000 y 300000 plaquetas/ μ l, se codifican con un 2.
N2	Concentración de plaquetas en el PRP. Ejemplo: valor entre 400.000 y 500000 plaquetas/ μ l. Código: 4.
N3	Células rojas en el PRP. Valores inferiores a 1×10^6 / μ l, código 0, y superiores un 1.
N4	Glóbulos blancos en el PRP. Codificación con 0 los valores inferiores a los basales en sangre; con un 1 los valores entre 1,01 a 2 veces superiores, 2 para valores entre 2,01 y 3 veces superiores, y así sucesivamente.
N5	Activación externa. Código 0 si no existe, y un 1 en caso afirmativo.
N6	Adición de calcio. Código 0 si no existe, y un 1 en caso afirmativo.

El modo en que se produce **la activación de las plaquetas** es otra característica importante del PRP obtenido. De manera fisiológica, se produce por el contacto de las plaquetas con el colágeno subendotelial, el ADP o la trombina local. La activación es más lenta que la producida por los agentes externos. En el caso de optar por la activación provocada, los métodos más habituales son el empleo de **cloruro cálcico o trombina**, aunque también es posible emplear métodos térmicos como la congelación (142). Se provoca la activación en los minutos previos a la infiltración, y se produce una liberación progresiva del contenido plaquetario, desde transcurridos aproximadamente 15 minutos (143).

1.5.5 Aplicación del PRP obtenido: total vs parcial.

Es importante destacar si se emplea la totalidad del PRP obtenido, dado que puede provocar diferencias en el proceso de regeneración que se pretende potenciar. Todo estudio debería reflejar la **cantidad de PRP empleado en relación con el total de PRP obtenido (%)**. Algunas casas comerciales distinguen entre PRP Pobre y Rico, porque existe una mayor concentración plaquetaria en la parte más cercana a la capa intermedia de leucocitos. Pero la realidad es que lo que se produce es un gradiente de concentración plaquetaria, y ese PRP “pobre” (PPP) si tiene plaquetas, además de otras moléculas que pueden ser importantes en la regeneración tisular (apartado 5.1, discusión).

También se debe tener en cuenta el **volumen de PRP** que se infiltra. En un tejido como el músculo es posible infiltrar cantidades grandes, superiores a 10 ml. En base a las publicaciones previas y con la intención de mejorar el proceso de regeneración, parece razonable infiltrar la zona lesional y todo el tejido circundante, para lo que suelen ser necesarias cantidades intermedias o grandes de PRP.

1.6 PRP EN LA REGENERACIÓN TISULAR

1.6.1 Definición y conceptos generales

El Plasma Rico en Plaquetas es un concentrado de plaquetas obtenido a partir de una muestra de sangre periférica, que se obtiene habitualmente mediante centrifugación con el objeto de separar sus componentes (144). Las plaquetas que se obtienen son biológicamente activas, y su concentración es superior a los valores habituales encontrados en sangre. Los numerosos factores de crecimiento y citoquinas presentes en sus gránulos- α son los principales responsables de la modulación del proceso de reparación del tejido dañado (145).

El primer factor de crecimiento conocido fue el factor de crecimiento neuronal (NFG), descubierto en 1947 por la italiana Rita Levi-Montalcini. Ayudó al conocimiento del crecimiento celular, y a partir de entonces se comenzó con el estudio de concentrados plaquetarios en el contexto de la trombosis (Kingsley, 1954) (146). Posteriormente, el concepto y descripción de PRP se desarrolló en el campo de la hematología en los años 70, empleándose como un producto de transfusión en pacientes con trombocitopenia (147). Tuvo su continuación en los años 80 en el ámbito de la Cirugía Cardíaca y en el tratamiento de úlceras, y posteriormente se utilizó como fibrina (PRF) en Cirugía Maxilofacial (148). A principios del presente siglo, el doctor Mikel Sánchez y su equipo comenzaron a emplear infiltraciones de PRP en patologías del aparato locomotor, en el ámbito de la Cirugía Ortopédica y Traumatología y en la Medicina del Deporte (149). También aparecieron los primeros artículos en estas áreas empleando suero autólogo condicionado (150, 151).

La seguridad de uso de los concentrados plaquetarios, al tratarse de productos autólogos, junto con la facilidad para su obtención y los teóricos beneficios asociados, provocaron su empleo en múltiples patologías, por delante incluso del desarrollo de ensayos clínicos que aportasen evidencia científica para su empleo (152). Progresivamente, a lo largo de las dos últimas décadas, la investigación y el uso del PRP se han extendido a múltiples especialidades médicas y patologías, como la Cirugía Plástica y Reparadora, la Oftalmología, la Dermatología o la Cirugía Vasculare (153).

En el aparato locomotor se han realizado numerosas investigaciones en distintas patologías, ampliándose progresivamente el uso de distintos tipos de PRPs (144), (154). Actualmente, se emplean PRPs en patologías agudas, como las lesiones musculares (155-157), roturas meniscales periféricas (158), o roturas de ligamentos (159). También en patologías crónicas, como lesiones osteocondrales (160), artrosis leve-moderada (161), necrosis avascular ósea (162) o patología tendinosa (163).

Los resultados positivos en la regeneración tisular con el tratamiento de PRPs se relacionan con su capacidad de mejorar procesos como la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis o la modulación de la respuesta inmune (68), (164).

En una lesión aguda muscular se producen grandes modificaciones en el **microambiente celular** en un periodo breve de tiempo (apartado 1.3). En un daño crónico, los mecanismos para la reparación muscular no funcionan con normalidad, el microambiente se encuentra alterado, y se produce la destrucción progresiva del tejido, o su sustitución por otro de peor calidad. Para emplear PRPs en el tratamiento de una lesión, aguda o crónica, hay que tener en cuenta que existen múltiples factores que puede modificar el resultado del tratamiento, y que pueden ser responsables de las diferencias en los resultados de las investigaciones. Algunos de estos factores pueden ser el **producto infiltrado, el protocolo de aplicación y el tipo de tejido lesionado** (157), (165, 166). También pueden existir otros factores relevantes que habitualmente no se consideran, como la edad o el tipo de rehabilitación, u otros desconocidos. A medida que se avanza en el conocimiento de las bases biológicas de la curación de los tejidos, y se registran y evalúan los resultados, es posible desarrollar mejores protocolos y mejorar la eficacia terapéutica de los PRPs (167) (González-Iglesias, 2013; anexo 1).

1.6.2 Producto: composición y volumen

Una característica fundamental en la **composición** de un PRP es la presencia o no de leucocitos (138), debido a los cambios que se establecen a nivel molecular. Los leucocitos pueden aumentar las concentraciones locales de mieloperoxidasa (119), con posible daño en el tejido sano (balance catabólico), y aumentar en exceso las concentraciones de TGF- β , con abundante depósito de colágeno y posible fibrosis (81), por lo que el L-PRP no parece una buena opción para el tratamiento de la lesión muscular aguda, aunque esta cuestión continúa en debate.

Dada la importancia del contenido celular y molecular del concentrado plaquetario empleado, el PRP debe estar siempre caracterizado o descrito, en relación con su obtención, composición y aplicación, tanto en investigación como en la práctica clínica. Es algo que con frecuencia no ocurre. Muchos autores asocian las diferencias en los resultados del tratamiento de una determinada patología a la variabilidad en la composición de los productos infiltrados (140), (168-170).

También es fundamental registrar **el volumen** del producto infiltrado, ya que mediante su caracterización previa podremos calcular la dosis total de plaquetas, leucocitos o eritrocitos infiltrados (171).

En estudios de laboratorio con PRP se ha observado efectos dosis-dependientes sobre las células satélite, tanto en su proliferación (63), (120), (172), como en su diferenciación (63), (120), (173), y en la migración celular (48). Sin embargo, esa relación directa no se encuentra en muchos otros artículos (174).

Estas diferencias pueden deberse a que es probable que la acción de la mayoría de los factores de crecimiento dependa de la **concentración en el microambiente local**, y no de su dosis total

administrada. En estudios focalizados en un único Factor de Crecimiento, como el VEGF , se ha observado esa acción dependiente de la su **concentración alrededor de las células productoras** (126). Gianni-Barrera, en un artículo muy interesante del 2020, indica que la concentración del VEGF tiene que tener dos características importantes para hacer su efecto terapéutico (114):

1. **Gradiente de concentración.** Se debe a la fuerte interacción del VEGF con la matriz extracelular, con distintos grados de afinidad según su isoforma. Se necesita un equilibrio entre difusión y unión. La isoforma más corta difunde más en el tejido y la más larga se queda localizada en el lugar de producción. La isoforma intermedia genera gradientes intermedios (175).

2. **Distribución homogénea.** Se observó que mioblastos modificados genéticamente con un vector viral para producir VEGF y expandidos (poblaciones monoclonales) producían VEGF en cantidad y distribución homogénea y se producía angiogénesis normal. No se conseguía cuando era introducido el vector viral en una población heterogénea de miocitos, produciéndose distintos niveles de VEGF alrededor de la célula productora (176).

Aunque se simplifique el estudio de los PRPs y se centre fundamentalmente en algunos pocos factores de crecimiento, el secretoma plaquetario contiene cientos de proteínas de señalización (8). Actualmente, se realizan estudios descriptivos más amplios utilizando la tecnología proteómica (177). Los análisis bioinformáticos ponen en evidencia diversos mecanismos de acción dependiente de contexto, así como diferencias entre PRPs atribuibles a la edad (178).

Dado que el efecto terapéutico es el resultado de la interacción de estos productos multimoleculares con el tejido receptor, hay que poner el énfasis no solo en la formulación de PRP, sino también en qué **estadio de los mecanismos de reparación** intervenimos. Esta dimensión temporal del efecto biológico del PRP permanece sin descifrar.

1.6.3 Protocolo: número de infiltraciones, momento de infiltración y técnica.

El número de infiltraciones de PRP necesarias para mejorar una determinada patología es un factor poco estudiado. En el tratamiento de la artrosis moderada de rodilla, generalmente se emplean protocolos de tres infiltraciones, separadas por periodos de una semana. En los ensayos aleatorizados publicados sobre el tratamiento de las lesiones musculares con PRP, se ha empleado en casi todos una única infiltración, y dos en uno de ellos (179).

En un estudio con conejos, publicado el año 2021, Yasui y colaboradores realizaron lesiones condrales en el cóndilo femoral interno en dos rodillas de 48 conejos, y no encontraron beneficios en la infiltración seriada (2 o 3 infiltraciones) frente a la infiltración única (180). En cambio, en otra publicación del mismo año, Chou y colaboradores revisaron distintos estudios en los que se empleaba PRP en el tratamiento de artrosis de rodilla leve-moderada, encontrando que la terapia de 3 inyecciones de PRP tuvo la mejor eficacia en el alivio del dolor y la mejora de la función en comparación con las terapias de 1 y 2 inyecciones (181).

Por otro lado, el primer artículo que incidió en la importancia del **momento de infiltración** en la regeneración muscular pertenece a Wright-Carpenter, y data del año 2004 (150). En su estudio, provocó una lesión por contusión en el músculo gastrocnemio de ratones, e infiltró suero autólogo condicionado a las 2, 24 y 48 horas. Comparó la histología de cada lesión con un grupo control con homeopatía, observando una mayor activación de las células satélite a las 30/48 horas y un mayor diámetro de las miofibras a los 7 días. Por lo tanto, encontraron resultados favorables asociados a la infiltración de las 24 horas. Curiosamente, ya indicó las posibles aplicaciones de los concentrados plaquetarios en el ámbito del deporte y también en situaciones postoperatorias. Posteriormente, otros autores le ha prestado también atención al momento de la infiltración en diferentes artículos: Van den Dolder, 2004 (182), Mosca, 2015 (183), Denapoli, 2016 (119), pero muy probablemente es una variable no considerada en su justa medida. En la mayoría de los artículos publicados sobre lesiones agudas en los tejidos, el factor tiempo se mide en días, cuando la regeneración del tejido es un proceso dinámico en donde se producen grandes modificaciones celulares y moleculares en las primeras 100-120 horas. Parece mucho más adecuado indicar las **horas transcurridas** desde la lesión hasta el momento de la infiltración. Probablemente, a la hora de poder influir de manera exógena en el proceso reparativo/regenerativo de un tejido, el factor más relevante sea el momento en el que se produce la infiltración.

Tras la lesión muscular se produce un proceso dinámico donde numerosas células van cambiando su fenotipo, lo que implica la expresión de distintos receptores y la secreción de distintas moléculas. En función del momento en que se produce la exposición a una enorme cantidad de moléculas, las respuestas celulares pueden ser distintas. En este sentido, Yang y colaboradores presentan, en el año 2022, el primer artículo que demuestra la contribución directa de los macrófagos en la regeneración de las lesiones osteocondrales en función de su fenotipo (184). Destacan que los macrófagos promueven la regeneración del cartílago **en función de su fenotipo y en un modo tiempo-dependiente**. Provocaron quirúrgicamente lesiones osteocondrales en 105 ratones y realizaron infiltraciones articulares con distintos tipos de macrófagos que cultivaron previamente: **M1** (CD86+, IL-1 β , TNF- α), **M2a** (CD206, IL1R α , Arg1) y **M2c**, que presentan algunas características de ambos: niveles moderados de IL-1 β y de IL1R α , junto con expresión elevada de CD163, IL-10 y TGF- β (185). Estas infiltraciones fueron realizadas de manera inmediata tras provocar una lesión osteocondral, el día 0, o a los 14 días. A las 4 semanas, la regeneración aún era pobre, como se esperaba, pero se pudo observar que el momento de la infiltración tuvo efecto positivo al infiltrar los macrófagos M2c. Ambas infiltraciones con macrófagos M2c provocaron regeneración del hueso subcondral, y además, de manera única, la infiltración del **día 14** provocó la regeneración del cartílago.

Por último, cabe destacar que la infiltración debe ser guiada mediante **ecografía**, con una buena difusión del plasma intra y peri lesional (186, 187) . Una posibilidad de distribución al infiltrarlo es “a modo de agujas de reloj”, para conseguir una zona de difusión amplia (164).

1.6.4 Tejido lesionado

Existen evidencias de la importancia que tienen las características del tejido lesionado, como la celularidad, la vascularización o el tamaño de la lesión, para conseguir que el producto biológico infiltrado tenga un efecto positivo en la regeneración tisular (144). Cada tejido tiene una **capacidad regenerativa** propia, asociada a factores como el número de células madre presentes o la cantidad de vascularización (47).

1.6.5 Edad y lesiones previas

La **edad** también puede ser un factor que modifique el resultado del tratamiento con PRP. Existen distintas publicaciones recientes que estudian el efecto de la edad sobre la composición del PRP (188, 189), el fallo asociado a la modulación de la respuesta inmune (190), los cambios en la remodelación de la matriz extracelular (191), o los cambios en las MSCs y en la composición del nicho donde se encuentran (192). Sin embargo, no existen estudios comparativos entre pacientes jóvenes, con diferencias de edad pequeñas (10 o 20 años). Esos años de diferencia podrían tener alguna repercusión en la capacidad regenerativa de las células, bien por exigencia mantenida y cambios en la propia estructura muscular, o porque los antecedentes de lesiones previas importantes puedan generar en los macrófagos y las células Natural Killer una inmunidad inespecífica “entrenada” (memoria inmunológica) (193), que puede implicar una respuesta específica ante la lesión muscular (apartado 5.2.2).

Igualmente, el hecho de haber sufrido **lesiones previas** en la misma localización, puede haber modificado las características del tejido (fibrosis) y dificultar el proceso de curación. Son factores que han de ser tenidos en cuenta y registrados, para proceder a su análisis y obtener información sobre su relevancia.

1.6.6 Otros factores

La **activación de las plaquetas** antes de una infiltración tiene el objetivo de obtener mayor concentración local de factores de crecimiento y citoquinas (194), y con una mayor rapidez. Esta activación influye en la cinética de liberación de los factores de crecimiento, y podría tener repercusiones en la regeneración del tejido, aunque esto no está aún bien definido. La activación exógena del PRP se realiza habitualmente con cloruro cálcico o con trombina. También es posible realizarla con métodos térmicos como la congelación (142). El método más empleado es la exposición a cloruro cálcico, que se asocia in vitro a una liberación precoz del contenido plaquetario, aproximadamente a partir de los 15 minutos (143). También es posible infiltrar el PRP sin activación previa, lo que ocurrirá de forma natural al entrar en contacto con la matriz extracelular.

Del mismo modo, **el tipo de estructura** con la que se presenta el concentrado plaquetario puede ser relevante para la cinética de liberación de factores. Se ha comprobado que el andamiaje o “scaffold”, como el coágulo de fibrina, implica una velocidad de liberación de factores que puede variar en relación con sus funciones, tanto en las primeras horas como a lo largo de los días y semanas (105).

Por último, cabe destacar que la presencia de alguna enfermedad, como diabetes o patologías hematológicas, podría afectar a la capacidad regenerativa de un tejido.

1.6.7 Acciones y mecanismos de regulación

Existe un beneficio teórico asociado al uso de PRP en la lesión muscular en humanos, que se basa en los numerosos hallazgos observados en investigaciones con PRP in vitro e in vivo. Esto fue muy bien reflejado en el año 2019 por Kunze y colaboradores (174), en un gran trabajo de revisión sobre las publicaciones en ciencia básica relacionadas con el uso de PRP en las lesiones musculares. En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los mecanismos e interacciones que se producen para la curación del tejido muscular dañado, lo que permite seguir avanzando en la optimización del uso del PRP (131).

El PRP puede actuar sobre los múltiples procesos implicados en la regeneración muscular, como son la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la neurogénesis y el control en el depósito de colágeno y de otras proteínas de matriz extracelular (68) (Figura 18).

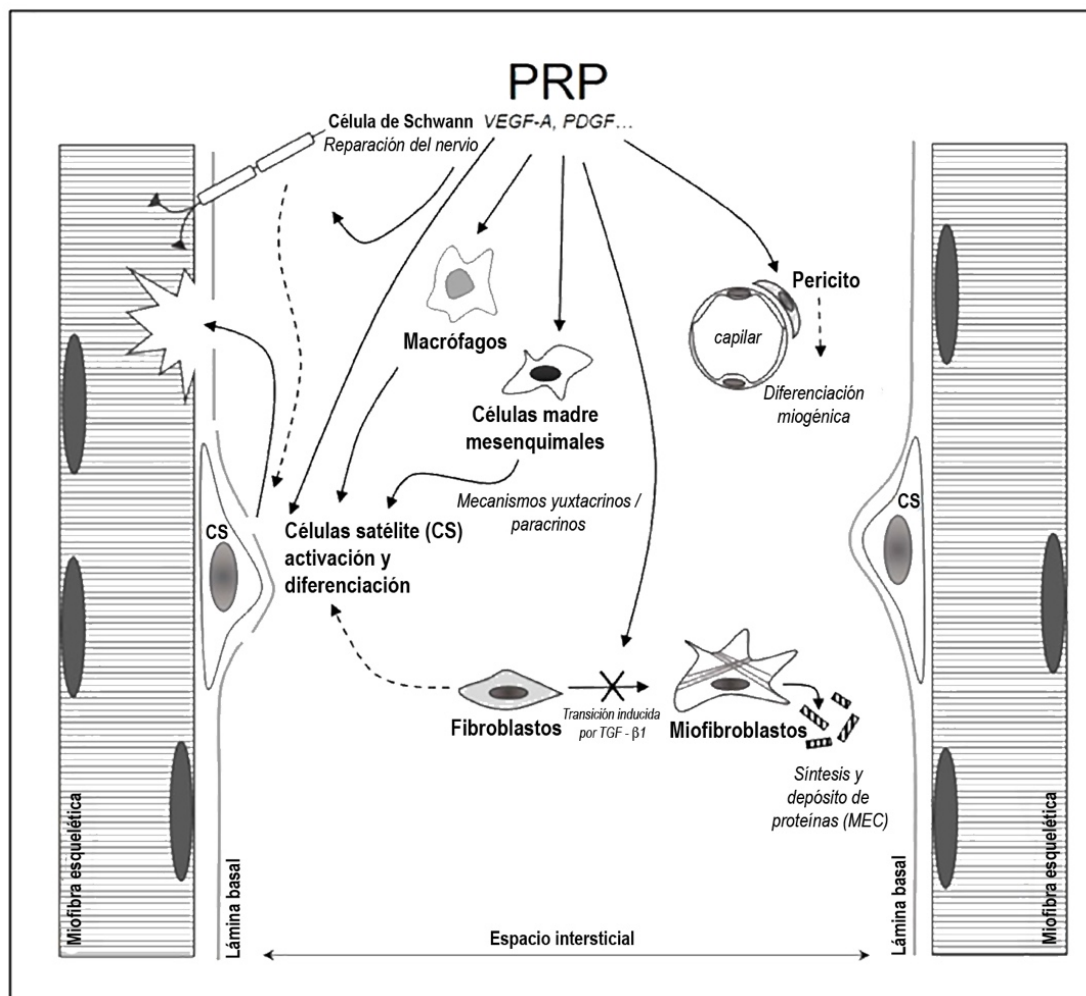


Figura 18 - Acciones del PRP en la regeneración muscular.
(Chellini, 2019)

I. Regulación positiva de la miogénesis.

Son múltiples las proteínas que actúan en el proceso de reparación del tejido, posiblemente muchas más de las que conocemos en la actualidad, e intervienen en distintos mecanismos que regulan la regeneración muscular.

Proliferación celular.

El efecto positivo del PRP leuco-reducido en la proliferación de las células satélite y los miofibroblastos está ampliamente demostrado, tanto en estudios de laboratorio (48), (120), (150), (195), como en vivo (42), (45), (196).

Son múltiples los mecanismos que pueden estar implicados en la proliferación celular. Por un lado, el PRP provoca el aumento de la expresión de distintos genes en los miofibroblastos, lo que provoca el aumento progresivo de proteínas, la movilidad celular y la proliferación celular. Algunos ejemplos son:

- Síntesis de proteínas de cadena pesada de miogenina y miosina. En un estudio de laboratorio, se observó su aumento mediante la activación del mecanismo de señalización ERK, que son proteínas que intervienen en la ruta de señalización RAS/ERK, cuya función es el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular en condiciones fisiológicas. El aumento en laboratorio fue dosis dependiente: mayor cantidad de PRP implicó una mayor respuesta (197).
- Aumento de la expresión de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular, como la proteína del núcleo PCNA, ciclina A2, ciclina B1 y las ciclinas dependientes de quinasa cdk1 y cdk2 (172).
- Aumento de la movilidad de células satélite. Mediante regulación positiva de proteínas de adhesión y remodelación del citoesqueleto de F-actina (48). También se favorece la síntesis de metaloproteasas de matriz (MMP-2) (77), que permiten la degradación de la lámina basal y la migración de células mioblásticas.

También se llegó a observar, por acción del PDFG-BB, la proliferación de las células satélite, junto con la inhibición simultánea de su diferenciación (198). Esto sugiere la posibilidad de emplear de manera terapéutica determinados factores de crecimiento en fases concretas de la regeneración tisular. Pero existen numerosas dificultades asociadas, como la dosificación local, por la corta vida media de los factores de crecimiento, escasa retención local, posible exceso de dosis o necesidad de determinados gradientes de concentración, junto a un elevado coste de producción (113).

Diferenciación celular.

El efecto del PRP sobre la diferenciación de los mioblastos hacia miofibras ha sido más difícil de demostrar. Se han llegado a observar resultados in vitro en este sentido en múltiples estudios:

- Kelc, 2015 (199): uso de PRP junto con un inhibidor de TGF- β .
- McClure, 2016 (173): inhibición de la vía Erk, con disminución de la proteína miogenina (proliferación de las células satélite) y aumento de la expresión de la proteína Myod (diferenciación hacia mioblastos).
- Qian, 2017 (200): el PRP puede favorecer la diferenciación de diferentes MSCs.
- Miroshnychenko, 2017 (120): diferenciación de las células satélite (formación de miotúbulos) asociada al Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), de manera dosis dependiente.

Acción combinada de proliferación y diferenciación.

Es probable que el PRP Puro favorezca ambos procesos a nivel celular, mediante mecanismos como el equilibrio en el microambiente celular de factores como el PDGF y VEGF. Ambos activan

la proteína Cyclin D1 en la célula satélite, que regula la progresión del ciclo celular (transición G1/S), favoreciendo de este modo la **proliferación celular** (201). También aumentan la actividad de determinados factores de transcripción en las células satélite, como algunas proteínas con estructura básica hélice-bucle-hélice (bHLH) (202), lo que provoca un aumento de proteínas como MyoD y Myf5: inicio de la **diferenciación** (203).

Scully, en el año 2019 (63), demuestran que el liberado plaquetario promueve la miogénesis esquelética a través del eje PDGF/VEGF-CiclinaD1-MyoD-Scrib-Myogenin, acelerando la regeneración del músculo esquelético después de una lesión aguda.

Estimulación del Sistema Inmune

El PRP tiene capacidad para activar los macrófagos M1 infiltrados en la fase inicial de la lesión muscular aguda (204). También se ha demostrado que el PRP Puro favorece la presencia y actividad de los macrófagos M2 (205). Por lo tanto, es posible que en función del momento en el que se infiltra PRP se produzca prioritariamente un efecto u otro.

II. Angiogénesis

Existen dos mecanismos principales para la formación de nuevos vasos, descritos por Gianni-Barrena en un excelente artículo (114), en el año 2020: brote e invaginación-división (Figura 19).

El mecanismo mejor estudiado es el “brote”, por el que hay células endoteliales especializadas que detectan un **gradiente de concentración de VEGF** y migran hacia su origen (quimiotaxis), formando una “punta”. Son seguidas por células pediculadas que forman la pared del nuevo vaso, y constituyen la base o “tallo” (115). En este caso, la proliferación de las células mesenquimales de la base está regulada por la **concentración absoluta** de VEGF (206).

La vía que regula la formación equilibrada de las células de la punta y del tallo es la vía de señalización Dll4/Notch1. La primera célula endotelial que detecta el gradiente de VEGF se convierte en una punta por defecto y aumenta la expresión del ligando Dll4. Esto activa Notch1 en las células vecinas, que regulan a la baja tanto la expresión de VEGF-R2 como la de Dll4. Adquieren un fenotipo de tallo, a través de un mecanismo de inhibición lateral (207).

En el caso del mecanismo de invaginación-división, Gianni-Barrena, en el año 2013, describe su estimulación mediante niveles muy altos de VEGF, lo que implica saturación local de la matriz entre las fibras y ausencia de gradientes (123). Demostró más tarde, en el año 2018, que el mecanismo de invaginación también puede ser modulado por la presencia de PDGF-BB, al favorecer el reclutamiento de pericitos (115). Estas células tienen capacidad contráctil y rodean las células endoteliales de capilares y vénulas. Expresan en la membrana plasmática efrinaB2, que puede estimular las células endoteliales a través de su receptor EphB4 (interacción directa célula-célula) (208).

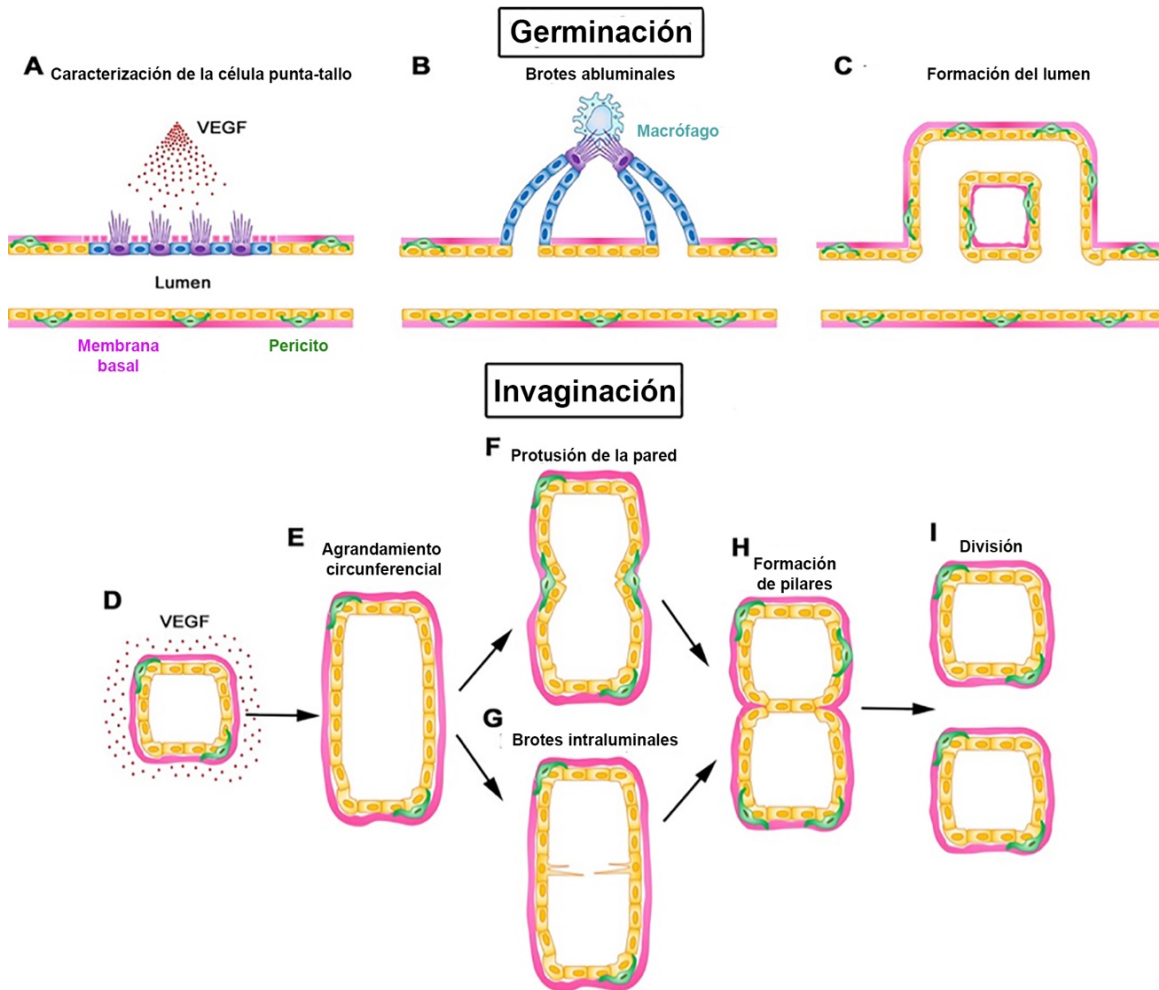


Figura 19 - Mecanismos para la angiogénesis.

A) Brote: asociado a un gradiente de concentración de VEGF. D) Invaginación: asociado a la concentración absoluta de VEGF en el microambiente. Fuente: Gianni-Barrena, 2020.

En investigaciones de laboratorio, se ha demostrado que el cultivo con pericitos con exposición a PRP aumenta su proliferación (118). Ocurre lo mismo en el caso del cultivo de células endoteliales (37).

También se ha observado recientemente, en un estudio in vitro (Berndt, 2021) (209), que el PRP y la combinación de PRP con ácido hialurónico son herramientas terapéuticas biológicas eficaces para provocar una angiogénesis mantenida, mientras que el lisado plaquetario tiene peor capacidad angiogénica.

Por último, cabe destacar que se han descrito efectos beneficiosos del plasma con menor concentración plaquetaria (Plasma Pobre en Plaquetas o PPP) en relación con la formación de vasos. Denapoli, en el año 2016, observa la presencia en el PPP de la proteína Flt-1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR1) (119). Por lo tanto, emplear todo el PRP Puro obtenido puede repercutir positivamente en la formación de vasos.

III. Estimulación de la neurogénesis

Se ha demostrado la influencia positiva de diferentes factores de crecimiento en el laboratorio y en vivo en la reparación y regeneración de los nervios periféricos (210). Zheng, en el 2016, observa un efecto positivo de la concentración de PRP en la proliferación, la función neurotrófica (supervivencia y desarrollo de neuronas) y la migración de las células de Schwann, y también se ha observado proliferación y migración de células dendríticas (38).

Hay multitud de células que ha sido observadas con una íntima asociación a estructuras nerviosas (72), como las células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y células madre mesenquimales como los progenitores fibroadipogénicos (FAP). Se han encontrado en el perineuro de fibras nerviosas, dentro de haces de nervios, y junto a las células que salen de los husos musculares (mecano transducción). Es probable que el PRP pueda estimular esta importante asociación entre el sistema inmune, el sistema nervioso y las miofibras, con mecanismos como el aumento local de TGF- β y la estimulación de las células FAP (41).

IV. Regulación del depósito de colágeno

Se ha demostrado la disminución del paso de fibroblastos a miofibroblastos en presencia de PRP. Este hecho, puede provocar una reducción de la respuesta fibrótica tras una lesión muscular (81), (211). El principal mecanismo que se ha relacionado con estos resultados es la vía del factor de crecimiento VEGF-A. Se une al Receptor 1 y provoca la inhibición de las señales TGF- β 1/Smad3 (212). De este modo se consigue un entorno favorable para la recuperación estructural y funcional del músculo. Pakshir, en el 2018, (39) describe la importancia de las interacciones entre los macrófagos y los miofibroblastos para el control adecuado del depósito de colágeno.

En resumen, los hallazgos encontrados en multitud de investigaciones nos indican que es posible mejorar en laboratorio y en animales los procesos de **proliferación y diferenciación de los precursores miogénicos**, así como mejorar la **angiogénesis, neurogénesis y reducir la fibrosis**, para crear un tejido estructural y funcionalmente similar al previo. El reto es trasladar estos efectos positivos asociados al PRP a las personas, en el deporte o en la actividad clínica, y objetivar los efectos producidos.

La complejidad de los mecanismos fisiológicos de la reparación tisular implica la presencia temporal de distintos fenotipos celulares en el tejido lesionado. Ello nos lleva a especular que **dependiendo de la fase temporal en que se encuentre la reparación, la intervención con PRP puede producir distintos resultados terapéuticos.**

Tabla 4 - Regeneración muscular y mecanismos moleculares.

A continuación, se presentan algunos de los principales mecanismos descritos en la regeneración del tejido muscular.

PROCESO	MECANISMOS	REFERENCIA
MIOGÉNESIS	El eje PDGF/VEGF–Cyclin D1–MyoD–Scrib– Myogenin es un eje molecular que acelera la regeneración después de la lesión aguda muscular (proliferación y diferenciación de células satélite).	Scully, 2019. "Platelet releasate promotes skeletal myogenesis by increasing muscle stem cell commitment to differentiation and accelerates muscle regeneration following acute injury".
ANGIOGÉNESIS	El gradiente de concentración de VEGF puede provocar el crecimiento de vasos en "brote", por migración de células endoteliales). La saturación local de VEGF (ausencia de gradientes) y la presencia de PDGF (reclutamiento de pericitos) favorecen la formación de vasos por invaginación-división.	Gianni-Barrena, 2020. "Therapeutic vascularization in regenerative medicine: Concise Review"
NEUROGÉNESIS	El aumento local de TGF-β puede estimular células progenitoras fibroadipogénicas (FAP) que se han encontrado asociadas a estructuras nerviosas.	Tidball, 2017. "Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system".
DEPÓSITO DE COLÁGENO	La presencia local de VEGF puede inhibir las señales TGF-β1 /Smad3, disminuyendo una respuesta fibrótica tras la lesión muscular.	Chellini, 2018. "PRP prevents in vitro TGF-β1 induced fibroblast to myofibroblast transition: Involvement of VEGF-A/VEGF receptor-1-mediated signaling".

1.7 INVESTIGACIONES PREVIAS SOBRE EL USO DE PRP EN EL MÚSCULO

1.7.1 Estudios en cultivos celulares y en animales

Dentro de las investigaciones a nivel de **ciencia básica**, cabe destacar el metaanálisis publicado por Kunze en el 2018 sobre el tratamiento de la lesiones musculares con PRP (174). En esta revisión sistemática fueron incluidos veintitrés estudios (15 in vivo, 6 in vitro y 2 in vitro/in vivo), en donde se evalúan los efectos del PRP sobre los mioblastos y/o miocitos. Al analizar estos estudios, lo primero que llama la atención es que la gran mayoría de los autores no reportaron la composición celular completa del PRP. Únicamente en un artículo se referencia el recuento de plaquetas, glóbulos rojos y leucocitos. Entre los resultados obtenidos en estudios de laboratorio, se observó proliferación celular en cinco, aumento de expresión de genes relacionados con la miogénesis en cuatro, y aumento de la diferenciación celular en tres. Entre los estudios in vivo, se reportaron resultados positivos con el uso de PRP en todos: aumento de la expresión de genes en cinco, regeneración muscular en tres y mejoría en la calidad del tejido muscular reparado en siete.

Como conclusiones, los autores destacan que la literatura científica básica sobre el uso del PRP en patología muscular demuestra que el tratamiento con PRP proporciona varios efectos potencialmente beneficiosos para la curación en comparación con los controles. Destacan la necesidad de investigaciones futuras para determinar la citología, la dosis, el momento y los métodos de administración óptimos del PRP.

1.7.2 Estudios clínicos en humanos

Hasta la fecha actual, se han publicados 7 estudios aleatorizados en deportistas lesionados para evaluar el efecto de las infiltraciones de PRP en el músculo esquelético (179, 213-218). También ha sido publicado el protocolo de un ensayo (219). La variable principal empleada habitualmente para conocer el efecto de un producto infiltrado es el **tiempo de baja deportiva (días)**. Se suele considerar como fecha de reincorporación *“el momento en que un jugador ha recibido autorización médica basada en criterios y está mentalmente listo para estar completamente disponible para la selección del partido y/o el entrenamiento completo”* (220, 221). Pero hay que tener en cuenta que hay otros factores, además del PRP, que pueden influir en los días de baja deportiva, como el tipo de lesión (20), la edad (189) o el momento de la infiltración (119), (150).

A pesar de la alta incidencia de las lesiones musculares en el fútbol (22, 23), y los elevados costes económicos que supone para los equipos (24), las investigaciones sobre su tratamiento con terapias biológicas son aún muy escasas. Solamente existen dos estudios focalizados exclusivamente en el fútbol y el tratamiento con PRP: una serie de casos (Zanon, 2016) (222) y un estudio piloto aleatorizado (Bezuglov, 2019) (217). Zanon y los colaboradores valoraron 25 lesiones en isquiotibiales, grado II, en 18 jugadores de fútbol profesional, sin encontrar una reducción relevante en los días de baja deportiva. Cabe destacar como limitaciones que no existía un grupo control y que se empleó PRP Puro sin incluir la fracción con menos plaquetas. Bezuglov publicó un estudio con 40 jugadores de la liga rusa con lesiones agudas en isquiotibiales grado 2A y 2B de la British Athletics Muscle Injury Classification (223), comparando PRP y rehabilitación frente a rehabilitación. Se observó un menor número de días de baja deportiva en los jugadores que recibieron PRP, pero el PRP no fue caracterizado, y tampoco se registró el momento de la infiltración, por lo que el resultado es difícilmente valorable. También existe una revisión sobre el uso del PRP en el fútbol desde una perspectiva ética (224) y otra genética (225).

En el meta-análisis de ensayos controlados aleatorizados publicado por Grassi y colaboradores en el año 2018, se analizó el efecto de las inyecciones de PRP en el tratamiento de las lesiones musculares agudas (155). Fueron incluidos seis estudios con 374 pacientes, y se evaluaron el tiempo para volver al juego, el dolor, las recidivas y las complicaciones, y variables funcionales como la fuerza y la flexibilidad, y las imágenes. El tiempo para volver al juego fue significativamente más corto en los pacientes tratados con PRP: la diferencia media fue de **7,17 días**. Pero al considerar los estudios a doble ciego (n= 2) o los estudios que solo incluían lesiones en isquiotibiales (n= 3), las diferencias encontradas fueron no significativas. Las recidivas y las complicaciones fueron similares entre los grupos, y tampoco se encontraron diferencias importantes en cuanto al dolor, la fuerza muscular, la flexibilidad o las imágenes. En cuatro de los estudios no se realizó el enmascaramiento de los pacientes, lo que implicó una calidad de la evidencia en estos estudios baja o muy baja, según el sistema GRADE (clasificación para la valoración, desarrollo y evaluación de las recomendaciones) (226). Grassi y colaboradores

concluyeron que no se han confirmado los teóricos beneficios del uso de infiltraciones de PRP para el tratamiento de lesiones musculares agudas. También consideraron que los estudios tienen una calidad limitada, existe heterogeneidad en los hallazgos y el tamaño de la muestra es limitado, por lo que la evidencia de los hallazgos debe considerarse baja o muy baja. Las infiltraciones de PRP son un procedimiento seguro con muy raros efectos adversos. A pesar de ello, los autores consideraron que su uso en la práctica clínica habitual no estaba justificado. Consideraron que el uso de PRP intramuscular en lesiones agudas debe limitarse a los **ensayos controlados**, hasta que surjan más pruebas positivas que sugieran lo contrario, reforzando la idea de que son necesarias más investigaciones y trabajos como esta tesis doctoral.

Al analizar cada uno de los estudios evaluados por Grassi y colaboradores, y añadiendo el posterior artículo de Bezuglov del año 2019, cabe destacar que en 3 de los 7 ensayos publicados no está caracterizado el PRP, y en otros dos estudios se empleó PRP leuco enriquecido. En relación con el Momento de la infiltración, en 3 de los 7 ensayos no se refleja, y en otro es muy tardío (Tabla 5). Por todo ello, los resultados de las investigaciones sobre el efecto de PRP en la lesión muscular aguda son difícilmente comparables.

Tabla 5 - Composición de los PRPs y resultados en ensayos aleatorizados en humanos. Adaptación y actualización de Grassi, 2018 (155).

2012-2021	N	TIPO DE PRP	Mom.	RESULTADOS (RTP)
1- Reurink (2015)	80	Plaquetas 433 x 10 ⁹ /L; Leucocitos 2 x10 ⁹ /L Dos infiltraciones. 3 ml. Control: suero salino isotónico	3 días (2-5)	SIN diferencias
2- Martínez-Zapata (2016)	71	Plaquetas 1381 x10 ⁹ /L; Leucocitos 0.11x10 ⁹ /L Una infiltración. 4-8 ml.	14	SIN diferencias
3- Bubnov (2013)	30	NO CARACTERIZADO. Una infiltración. 8 ml.	NR	- Grupo PRP: 10 ± 1.2 days - Control: 22 ± 1.5
4- Hamid (2014)	28	Plaquetas 1297 x 10⁹/L; Leucocitos 38.3 x10⁹/L Una infiltración. 3 ml.	4,6 (+-1,9)	- Grupo PRP: 26,7 ± 7 days - Control: 42.5 ± 20,6
5- Rossi (2015)	75	NO CARACTERIZADO. Una infiltración "proporcional" a la lesión.	2,3 (1-4)	- Grupo PRP: 21,1 ± 3,2 days - Control: 25 ± 2,8
6- Hamilton (2015)	90	Plaquetas 765 x 10⁹/L; Leucocitos 26,1x10⁹/L Una infiltración. 3 ml.	NR	SIN diferencias
7-Bezuglov (2019)	40	NO CARACTERIZADO. Una infiltración. 8 ml.	NR	- Grupo PRP: 11.4 ± 1.2 days - Grupo control: 21.3 ± 2.7

Adaptación y actualización de: Grassi, 2018: "Is PRP Effective in the Treatment of Acute Muscle Injuries? A Systematic Review and Meta-Analysis"

2 JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS Y MODELO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 JUSTIFICACIÓN

El PRP comenzó a utilizarse en el tratamiento de las lesiones musculares agudas de futbolistas hace casi dos décadas, a principios de este siglo. El objetivo principal era, y sigue siendo, conseguir una pronta recuperación funcional, asociado a una posible disminución de los tiempos en la reparación/regeneración tisular. También se considera que la mejora en la recuperación estructural podría provocar una disminución en las recidivas. La seguridad en su uso hizo que creciese su utilización, sobrepasando en gran medida la capacidad de la comunidad científica para generar evidencia sobre sus beneficios, a pesar de existir resultados contradictorios en cuanto a su eficacia y al protocolo adecuado para conseguirlo (155, 156).

2.1.1 Importancia en el ámbito del deporte y de la medicina

La mejora en la recuperación de las lesiones musculares puede tener una gran repercusión en el ámbito del **deporte profesional**, donde el nivel de exigencia física es máximo. La disminución de la disponibilidad de los jugadores supone una disminución del rendimiento de un equipo, con importantes pérdidas económicas asociadas (24). En el **deporte federado no profesional** las lesiones musculares son también muy frecuentes, con pérdida de días tanto para volver a la práctica deportiva como para regresar a las actividades cotidianas. Si se demuestra que un tratamiento reduce el periodo de recuperación y la incidencia de recidivas, millones de deportistas de distintas disciplinas se podrían beneficiar en todo el mundo.

En la **población en general**, las lesiones musculares suponen días de baja laboral en la población activa y limitación funcional importante en todos aquellos pacientes que se ven sometidos a cirugías con importante daño muscular. El conocimiento progresivo de los mecanismos celulares y moleculares que se activan tras la rotura de miofibras y su necrosis (36), contribuyen en la mejora metodológica del uso del PRP. Los nuevos protocolos que se van a ir desarrollando en el uso del PRP en el músculo dañado podrán ser aplicados en el ámbito quirúrgico. En concreto, en el ámbito de mi especialidad médica, la Cirugía Ortopédica y la Traumatología, las amplias incisiones sobre la musculatura son constantes en la mayoría de las cirugías. Mejorar el proceso de reparación del daño producido en intervenciones tan frecuentes y agresivas, como la sustitución protésica articular, puede mejorar los tiempos de recuperación y minimizar complicaciones. Esto supondría una importante disminución de costes para los sistemas sanitarios y una recuperación precoz de la calidad de vida de los pacientes.

2.1.2 Proyecto: planteamiento inicial y desarrollo

En los Servicios Médicos del Athletic Club de Bilbao hay una amplia experiencia en la utilización de PRP Puro en las lesiones musculares, siendo nuestros jugadores los primeros a nivel mundial en recibir este tipo de terapia. Las experiencias acumuladas son positivas, pero no se había empleado hasta ahora el método científico para evaluar el resultado. El presente estudio surgió para dar respuesta a la necesidad interna del Club de objetivar los teóricos beneficios asociados a la terapia del PRP, junto a mi inquietud por profundizar en los conocimientos de esta terapia (González-Iglesias, 2013) (167) (anexo 1).

La presente Tesis Doctoral representa el largo camino desde la revisión de las bases biológicas en la regeneración del músculo lesionado, pasando por los estudios en laboratorio, en animales y en humanos con el uso de PRP, hasta su integración en el desarrollo de un ensayo clínico aleatorizado con jugadores de fútbol. Se parte de la importancia de las plaquetas en la regeneración del músculo, actuando como reservorios fisiológicos de un gran número de mitógenos y factores de crecimiento (227), lo que contribuyó a plantear su uso como herramienta terapéutica en las lesiones músculo-esqueléticas.

El proyecto fue posible gracias al apoyo de la Fundación Athletic Club, que facilitó el único soporte económico del proyecto para el pago del seguro, y gracias a la colaboración por parte de los clubes participantes. La Fundación ayuda a estas entidades y sus equipos, dando el soporte médico a cualquiera de sus jugadores/as. Esta colaboración permitió la captación de los jugadores lesionados para su participación en el estudio.

La empresa comercializadora de los Kits para la obtención de PRP (Proteal, de Barcelona) cedió todos los kits de manera gratuita. Esta empresa fue comprada posteriormente por la farmacéutica internacional Fidia (sede central: Abano Terme, Italia; sede española: Alcobendas, Madrid). Se realizó el cambio del nombre de los kits, de Orthopras[®] al actual Hy-tissue[®]. Su sistema de obtención de PRP es cerrado y reproducible, y está homologado.

La propia Agencia Española del Medicamento, en su informe V1/23052013 respecto al uso de PRP en España, textualmente recomienda “animar a los investigadores a realizar ensayos clínicos adecuadamente diseñados para establecer niveles de evidencia adecuados en cada una de las patologías y tipos de PRP”.

2.1.3 Beneficios metodológicos

En el ensayo clínico planteado fueron estudiadas distintas variables con capacidad de influir en los días de baja deportiva de un jugador, y también las posibles interacciones entre variables. De este modo, se pretende avanzar en la comprensión del proceso de regeneración del músculo, y mejorar el protocolo de aplicación del PRP Puro (174). También podrían implementarse

distintos protocolos para el uso de PRP en distintas especialidades y tejidos. Algunos ejemplos de especialidades y patologías son la Cirugía Ortopédica y Traumatología (artrosis) (228), la Cirugía Maxilofacial (defectos óseos en implantología), Cirugía Vasculár (úlceras crónicas en las extremidades), Dermatología (alopecia) y Oftalmología (úlceras corneales) (229).

Para comprender procesos complejos como la reparación de un tejido, es posible simplificar lo que ocurre mediante el análisis de los factores implicados y sus interacciones. La respuesta frente a la agresión en un tejido, desde su extensa complejidad, presenta puntos comunes y puede ser interpretada hacia un “**modelo simplificado**”: un ensayo clínico donde analizar una variable dependiente, como el tiempo invertido en la recuperación funcional de la pierna lesionada, y su relación con una serie de variables explicativas, entre las que se encuentra el uso del PRP.

Con el producto biológico adecuado y en el momento/s óptimo, en base a las publicaciones de ciencia básica y en animales, es posible mejorar el proceso de reparación tisular en el músculo.

Además, el diseño de un estudio donde se investigan distintos factores e interacciones puede suponer claras mejoras metodológicas. En la mayoría de los artículos que se presentan actualmente en humanos, se calcula una vuelta al juego promedio de un grupo donde se ha empleado PRP Puro (días de baja deportiva o “Return To Play”), y se realiza una asociación directa entre el producto infiltrado y ese RTP calculado. Este planteamiento no parece adecuado, dado que la variable dependiente baja deportiva se puede ver influenciada por otros factores además del producto, como pueden ser el momento de infiltración del PRP (45), (230-234). El factor tiempo condicionará el microambiente del tejido receptor.

La regeneración del músculo lesionado se trata de un proceso complejo y dinámico, con distintas fases temporales, donde **intervienen distintos fenotipos celulares**, de los macrófagos, los linfocitos T colaboradores o las células satélite. Evaluar la importancia de distintos factores durante ese proceso, como el producto infiltrado, el momento de la infiltración, la edad del jugador/a y el tipo de lesión, y sus interacciones significativas, puede aportar información esencial para evaluar la eficacia del PRP Puro. Esto supone un nuevo enfoque, y puede ayudar a dilucidar las causas de los distintos resultados obtenidos en las publicaciones.

En esta tesis se pretende profundizar en el conocimiento del uso terapéutico del PRP, delimitando la relevancia de distintos factores a tener en cuenta. Los resultados pueden ser de ayuda para el desarrollo de un protocolo de uso del PRP Puro en lesiones musculares agudas. Además, resultados favorables podrían implicar el uso progresivo de terapias biológicas en los sistemas de salud públicos y privados, con un aumento posible en la calidad de vida de las personas.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis doctoral es:

Analizar la relación entre la infiltración de PRP Puro y el Tiempo de Recuperación en la lesión muscular aguda.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Obtener un **modelo predictivo del Tiempo de Recuperación** de la lesión muscular aguda, en función de los factores considerados en el ensayo clínico.
2. Determinar la **importancia de cada factor** en el Tiempo de Recuperación.
3. Proponer un **protocolo de uso del PRP Puro** para mejorar el Tiempo de Recuperación.

2.3 MARCO TEÓRICO DE INVESTIGACIÓN. HIPÓTESIS PRINCIPAL Y SECUNDARIAS

Con el fin de alcanzar el objetivo general y los específicos de esta Tesis Doctoral, se propone un **Marco o Modelo Teórico de Investigación** con el Tiempo de Recuperación como variable explicada o dependiente, y las variables explicativas o independientes siguientes:

- Tipo de lesión: lesión muscular simple (miofascial o intramuscular) y lesión de la Unión Miotendinosa (UMT).
- Tipo de Producto empleado: PRP Puro en el grupo de la intervención y un producto homeopático en el grupo control (Traumeel®).
- Momento de la infiltración, medido en horas transcurridas desde la lesión para la primera infiltración y en días para la segunda.
- Edad del paciente.

Para establecer la posible relación entre el PRP Puro y el Tiempo de Recuperación, se compararon los días de baja en el grupo infiltrado con PRP Puro frente al grupo infiltrado con un producto homeopático (Traumeel®), en lesiones agudas severas en los isquiotibiales.

HIPÓTESIS PRINCIPAL

Teniendo en cuenta los factores incluidos en la investigación, se plantea la hipótesis principal:

El conjunto de factores analizados modifica los días de baja deportiva asociados a las lesiones musculares agudas de isquiotibiales en los futbolistas.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS

A partir de la hipótesis principal enunciada anteriormente, se plantean las siguientes hipótesis secundarias de investigación con las variables explicativas.

- **H1:** el tipo de **Lesión** influye en el Tiempo de Recuperación.
- **H2:** el tipo de **Producto** infiltrado influye en el Tiempo de Recuperación (con independencia de cuando se infiltre).
- **H3:** las **Horas transcurridas** desde que se produce la lesión hasta que se aplica el tratamiento influyen en el Tiempo de Recuperación (con independencia del Producto o la Edad).
- **H4:** la **Edad** del paciente influye en el Tiempo de Recuperación.
- **H5:** la interacción entre el **Tipo de Producto** y el **Momento de su infiltración** influye en el Tiempo de Recuperación.
- **H6:** la interacción entre el **Momento de la infiltración** y la **Edad** influye en el Tiempo de Recuperación.

A partir de la hipótesis principal y las secundarias, se genera el Marco Teórico de Investigación que se presenta a continuación:

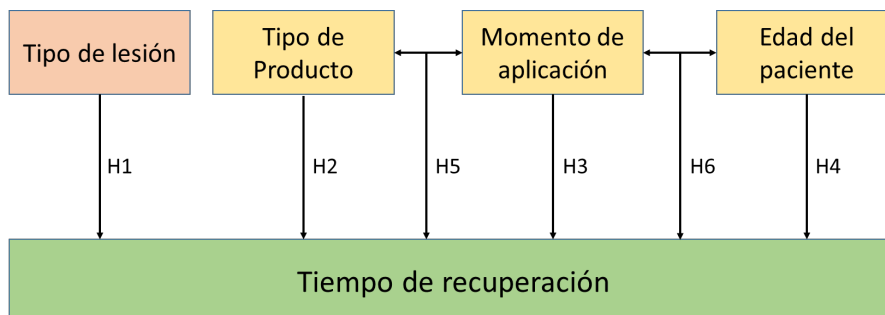


Figura 20 - Modelo Teórico de Investigación
Elaboración propia.

3 PACIENTES Y MÉTODOS

3.1 PACIENTES

La muestra incluida en el estudio fue de 40 jugadores federados de equipos de fútbol de Vizcaya que colaboran con el Athletic Club. Las categorías a las que pertenecen son: regional (10 equipos), tercera división (15 equipos), segunda división B (3 equipos). También participó el equipo de primera división femenina del Athletic Club (aportó una jugadora lesionada). La captación y el seguimiento de los jugadores se realizó desde el mes de octubre de 2016 hasta abril de 2020.

El volumen de carga media de entrenamiento fue de 3-4 sesiones semanales, de una duración media de 90 minutos, y un día a la semana de competición. El porcentaje medio del contenido fue un 60% técnico-táctico colectivo, 20% técnica individual y 20% preparación física individual.

La aleatorización de los pacientes fue realizada en bloques balanceados, y la intervención a realizar era comunicada telefónicamente al investigador previamente a la consulta médica. El enmascaramiento fue simple ciego: los participantes desconocían el tratamiento asignado a lo largo del desarrollo del estudio.

En el grupo de intervención (INT) se infiltró PRP Puro (n=20). La edad media fue de $25,3 \pm 4,4$ años, el peso medio fue $75 \pm 5,1$ kg, la altura media fue 179 ± 4 cm y el IMC medio fue $23,3 \pm 1,1$. En el grupo control (CON) se infiltró un producto homeopático (n=20), siendo la edad media $24,8 \pm 5,1$ años, el peso $73 \pm 6,2$ kg, la altura: 178 ± 5 cm y el IMC: $23 \pm 1,3$.

Los criterios de inclusión de los participantes fueron:

- Jugadores de fútbol federados y mayores de 18 años.
- Lesión aguda severa en los músculos isquiotibiales: parcial moderada o tipo 3B (clasificación de Munich) (17).

Los criterios de exclusión fueron:

- Desinserción tendinosa o lesión (sub)-total del músculo o tipo 4 (clasificación de Munich).
- Infiltración previa en la zona lesionada.

Además, no se incluyeron ocho pacientes por diferentes motivos: no querer participar en el estudio (cuatro), rechazar el pinchazo (dos), o querer un producto en concreto (uno), y un paciente fue retirado por no seguir las indicaciones (sufrió una recidiva el mismo día que se le indicó reposo).

A todos los participantes se les informó de las características del estudio, y firmaron el consentimiento informado. Fueron incluidos siguiendo el protocolo aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Euskadi (CEIC).

Se realizó una exploración médica y se registró el historial de cada paciente, para averiguar si tuvieron algún tipo de enfermedad o lesiones previas. Ningún participante tenía enfermedades, no fumaban ni bebían alcohol habitualmente, y no tomaron medicamentos o sustancias estimulantes. Trece jugadores tomaron analgésicos tipo AINES en las 48 horas siguientes a la lesión: diez tomaron ibuprofeno 600 mg (entre una y tres dosis), otros dos emplearon diclofenaco 50 mg (dosis única y 4 dosis) y otro dexketoprofeno 25 mg (4 dosis).

A continuación, se muestra gráficamente el protocolo de inclusión de paciente en el estudio (fuente: elaboración propia).

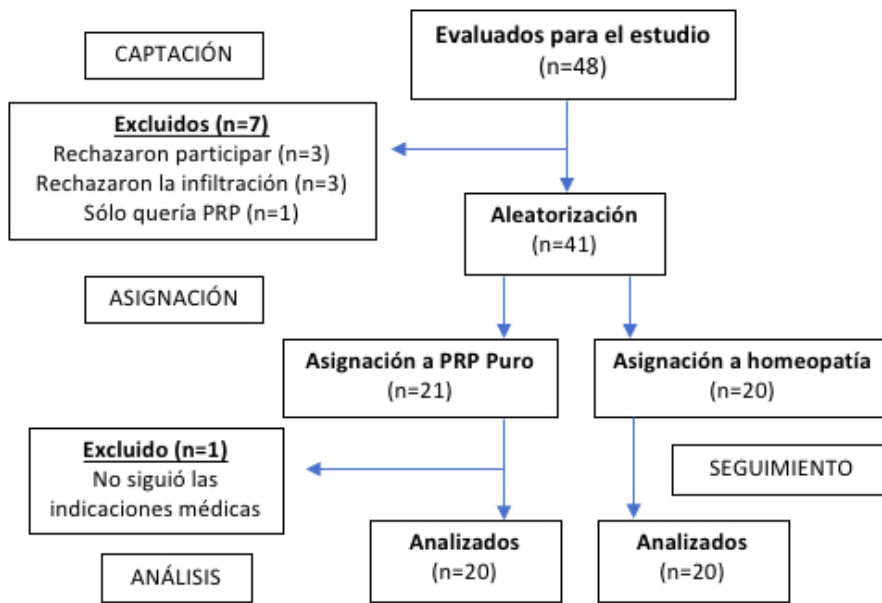


Figura 21 - Protocolo de inclusión de los pacientes en el estudio.

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación fue diseñada de acuerdo con la declaración de Helsinki (2008) (235) y la adaptación de Fortaleza (2013) (236). Fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación Humana de Euskadi. El protocolo de la investigación fue autorizado por la Agencia Española del Medicamento (EudraCT 2013-004141-32), y se registró en clinicaltrials.org (NCT03676205).

3.3 PROCEDIMIENTO

Los jugadores acuden a las instalaciones deportivas del Athletic Club en Lezama (Bizkaia, España) derivados desde sus equipos, al sufrir una lesión en el muslo: distracción traumática o lesión por sobreuso muscular que imposibilita participar parcial o totalmente en un entrenamiento o

partido (29). Desde octubre del 2016 hasta abril del 2020, un total de 40 pacientes fueron incluidos en el estudio, evaluados y monitorizados (237).

Se distinguen dos partes: primera, donde se realizan las infiltraciones (visitas 1 y 2), y una segunda, donde se realizan las valoraciones de control evolutivo (Figura 22).



Figura 22 - Procedimiento: infiltraciones y control evolutivo de los pacientes.

3.3.1 Primera parte: infiltraciones

Valoración médica inicial.

Se registró el mecanismo de producción de cada lesión, el dolor y la impotencia funcional en ese primer momento. Se exploró al paciente y se registraron los antecedentes personales. Se valoró el cumplimiento de los criterios de inclusión/exclusión, y se entregó el consentimiento informado (236).

Las imágenes ecográficas fueron compatibles con alteración estructural de fibras musculares (rotura de fibras). Se registró el músculo/s lesionado y la localización (proximal, central o distal) (25, 26). Se incluyeron en el estudio pacientes con lesiones parciales moderas o tipo 3B de la clasificación de Munich (17). Son roturas severas o grado II (16), en donde no hay afectación completa del músculo.

Según la afectación tejido conectivo (matriz extracelular dañada), se agruparon las lesiones como intramusculares y miofasciales (grupo I; mejor pronóstico) (238, 239) o miotendinosas (grupo II; peor pronóstico) (20).

El dolor inicial fue severo en todos los casos, con imposibilidad para seguir con la actividad deportiva. También se registró el dolor sentido durante las 24 horas previas a la primera visita

(VAS-P en reposo, al caminar y al subir y bajar escaleras) (240), que fue moderado-severo, pobremente localizado, e incapacitante (cojera asociada).

A la exploración, todos los jugadores presentaron dolor en decúbito prono ante la flexión de rodilla contra resistencia, y dolor al valorar el rango de movilidad articular (Range of Movement o ROM), o un déficit de entre 10-25° (28). También presentaban limitación funcional al andar y/o subir y bajar escaleras (241).

Infiltraciones.

Como parte de la técnica de enmascaramiento, a todos los jugadores se les extraía una muestra de sangre (18 ml). Se realizaba la preparación de la infiltración en otro espacio. En el grupo de intervención, esta muestra se empleaba para la preparación del PRP y su análisis posterior, mientras que en el grupo control se desechaba. El paciente desconocía el producto recibido.

Se infiltró en dos ocasiones a cada jugador, bajo control ecográfico y con previa activación del PRP con cloruro cálcico al 10%: 0,05 ml por ml de PRP (para 6 ml de PRP, se infiltraron 0,3 ml de cloruro cálcico).

- **Primera infiltración.** Se realizó habitualmente en el periodo **entre las 24 y 72 horas** después de la lesión, con una media de 54 ± 26 horas. Se empleó PRP Puro en cada infiltración del grupo INT ($5,8 \pm 1,1$ ml) y homeopatía en el grupo CON (4 ml). No se consideró necesario el ayuno previo a la infiltración. Se indicó reposo relativo durante 48 horas, por lo que se inicia la rehabilitación a los 4-5 días tras la lesión (242).
- **Segunda infiltración.** Se realizó con una media de **9 días después de la lesión**. En ambos grupos se indicó reposo relativo de 24 horas.

En primer lugar, y bajo control ecográfico, se infiltraba la zona lesionada, y a continuación la zona sana de alrededor. Si existía una colección hemática, se intenta drenarla. Para conseguir una buena distribución del producto, se dirigía la aguja en distintas direcciones (ventral, dorsal, lateral y medial a la lesión) (186).

3.3.2 Segunda parte: control evolutivo

Se realizaron visitas de control evolutivo a los 23, 30, y 37 días después de la lesión (220). También hubo visitas en días intermedios a estos últimos, en función de las necesidades del jugador. El primer control evolutivo, a los 23 días desde el momento de la lesión, representa una fecha precoz para las lesiones severas en isquiotibiales. Si un jugador tuvo una evolución muy favorable y regreso a la actividad deportiva antes de esa primera visita, se registró como fecha de vuelta al juego el día de su participación en un partido, entrenando o compitiendo.

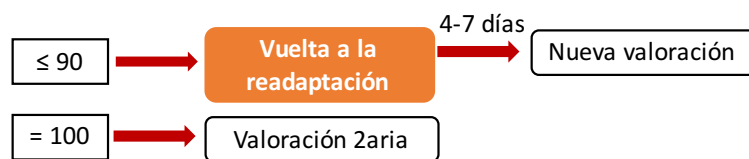
Para establecer el **alta médica** se empleó un modelo de decisión global, donde se interrelacionan criterios de tipo médico (síntomas, test funcionales), criterios psicológicos y criterios específicos del fútbol (manejo del balón) (243).

En el fútbol profesional han sido descritos 5 ámbitos principales de evaluación para establecer la vuelta al juego del jugador/a, tal y como recoge Zambaldi en su interesante artículo del 2017 (244). Los ámbitos son el rendimiento funcional, la fuerza, la flexibilidad, el dolor y la autoconfianza. Con estos principios, se evaluaron inicialmente cinco variables: la percepción del jugador sobre su recuperación (245), la flexibilidad (246), la fuerza (247), la adaptación al juego (248) y la imagen ecográfica (249). Si los resultados eran positivos (100 puntos), el jugador pasaba a la segunda parte de la evaluación, para valorar la distancia en triple salto unipodal (250) y el dolor sentido desarrollando la velocidad máxima en 20 metros (251), (252). Si ambas valoraciones eran positivas, se indicaba el **alta médica**.

La **vuelta a la readaptación** se producía al obtener puntuaciones inferiores a las establecidas como referencia. Suponía el regreso a la actividad progresiva, con limitación frente a situaciones de esfuerzo máximo.

Tabla 6 - Criterios de alta médica.
Fuente: elaboración propia.

CRITERIOS DE ALTA MÉDICA			
Primera parte			
VARIABLES	TEST	PUNTUACIÓN	
1) IMAGEN ECOGRÁFICA	Exploración ecográfica (incluido el modo doppler).	Mejoría	20
		Hiperemia (doppler)	10
		Hematoma	0
2) AUTOPERCEPCIÓN	Cuestionario con 10 preguntas. Valoraciones entre 1-5 puntos.	>=40	20
		35-39	10
		< 35	0
3) FLEXIBILIDAD	ROM de cadera: flexión pasiva en supino con pierna en extensión.	Asimetría <10%	20
		Asimetría 10-20%	10
		Asimetría >20%	0
4) FUERZA ISOMÉTRICA	Flexión de rodilla en prono contra resistencia a 15º. Dinamómetro manual.	Asimetría <10%	20
		Asimetría 10-20%	10
		Asimetría >20%	0
5) ADAPTACIÓN AL JUEGO	1. Conducción y regate. 2. Pase: corto y largo. 3. Recepción y remate.	Tres apartados	20
		Dos apartados	10
		Un apartado	0



CRITERIOS DE ALTA MÉDICA Segunda parte			
VARIABLES	TEST	PUNTUACIÓN	
6) DISTANCIA	Triple salto unipodal	Asimetría <10%	20
		Asimetría >10%	0
7) VELOCIDAD	Tiempo empleado en recorrer 20 metros. Dos repeticiones.	Sin dolor	20
		Con dolor	0



El **alta deportiva** (Return to Play o RTP) representa la vuelta al entrenamiento o competición sin restricción (124). Se registró como fecha de alta deportiva el día siguiente al alta médica.

La **baja deportiva, o tiempo de Recuperación**, fue considerada como los días transcurridos desde la fecha de la lesión hasta la fecha del alta deportiva.

3.4 PRODUCTOS E INSTRUMENTOS EMPLEADOS

Los productos empleados en el estudio fueron los siguientes:

A. PRP. El sistema utilizado para la obtención del PRP fue cerrado (Hy-tissue; laboratorios Fidia). Se obtenían 18 ml de sangre periférica, se mezclaban con 2 ml de anticoagulante (citrato sódico; proporción 9:1) y se centrifugaban durante 8 minutos, a 1800 rpm, con la obtención de una media de 5,8 ml de PRP. La activación plaquetaria se realizaba con cloruro cálcico, unos dos minutos antes de la infiltración (Tabla 7).

Se empleó un PRP con una concentración media de plaquetas entre 400-500 x10³/μL, hematíes 0,02 x10⁶/μL y leucocitos 0,02 x10³/μL. Estos valores corresponden a un **PRP Puro** (132). Según la codificación que plantean Kon y colaboradores en su artículo del 2020, es un PRP con código **24-00-11** (Tabla 8).

Tabla 7 - Descripción del PRP empleado: obtención, composición, aplicación
Basada en la clasificación de Kon, 2020 (132).

1. Preparación del PRP	
Volumen sanguíneo inicial	18 ml
Anticoagulante	Citrato sódico (2 ml)
Sistema	Cerrado (Hy-Tissue)
Centrifugación	Si
- número	1
- velocidad	1800 rpm
*Volumen total de PRP	5,8 ml
2. Características del PRP	
Tipo de PRP	24-00-11
Volumen Plaquetario Medio	9,3 fL
Eritrocitos	$0,02 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($<1 \times 10^6/\mu\text{L}$)
Glóbulos blancos	$0,02 \times 10^3/\mu\text{L}$ (menos que línea basal)
Activación	Cloruro cálcico
3. Aplicación	
Formulación	Líquido
Modo de administración	Infiltración ecoguiada
Dosificación	2 infiltraciones 1ª. 24-72 horas tras la lesión 2ª. 9 días tras la lesión
Volumen infiltrado	5,8 ml (totalidad del PRP obtenido)
Dosis (plaquetas infiltradas)	Media 450×10^9 plaquetas/ml Dosis total: 2610×10^9 plaquetas Rango $2000-3000 \times 10^9$ plaquetas
Tejido	Músculo
Patología	Lesión muscular aguda en isquiotibiales: intramuscular/miofascial, y unión miotendinosa
4. Otros	
Edad	Media de 25 años
Deporte y nivel	Jugadores de fútbol federados (3-4 días de entrenamiento + partido)

Tabla 8 - Sistema de codificación del PRP.
Basada en la clasificación de Kon, 2020.

Codificación (N1-N6): 24-00-11
N1. 200000 – 300000 plaquetas/ μ L en sangre (2)
N2. 400000 – 500000 plaquetas/ μ L en PRP (4)
N3. Eritrocitos $<1 \times 10^6/\mu$ L (0)
N4. Glóbulos blancos: menos que la línea basal (0)
N5. Activado (1)
N6. Cloruro cálcico (1)

C. **Homeopatía.** Se empleó un producto homeopático en el grupo control: Traumeel, cuyo fabricante es Biologische Heilmittel Heel. En su composición hay múltiples compuestos a muy bajas concentraciones: Arnica Montana, Caléndula officinalis, Hamamelis virginiana, Echinacea angustifolia, Echinacea purpurea, Chamomilla recutita, Symphytum officinale, Bellis perennis, Hypericum perforatum, Achillea millefolium, Aconitum napellus, Atropa belladonna, Mercurius solubilis Hahnemanni, Hepar sulfuris. La dosis de una ampolla es 16,69 mg en 4 ml.

Los instrumentos utilizados para evaluar las variables implicadas en el alta médica fueron los siguientes:

1. **Ecógrafo.** Se utilizó un ecógrafo con sonda lineal, modelo BT12, de General Electrics. La validez predictiva para el RTP, tanto de la ecografía como de la RMN, es limitada. Las consideraciones son las descritas por Hall y colaboradores (249): la presencia de cualquier hematoma residual se valora como factor de alto riesgo para una recidiva, y riesgo intermedio al aumento de flujo en modo doppler dentro de la zona de la lesión, o alrededor de una zona de cicatriz.
2. **Test de autopercepción.** Se empleó el cuestionario desarrollado por Pedro Gómez y colaboradores en el año 2014 (245) y validado por un panel de 16 expertos en el ámbito del RTP en el fútbol. Para diseñarlo fue empleada la técnica “Delphi modificada”: proceso interactivo, anónimo y de retroalimentación controlada con el grupo de expertos.
3. **Goniómetro-flexibilidad.** El jugador se coloca en decúbito supino y se realiza un movimiento pasivo de flexión de cadera con la pierna en extensión. Se miden los grados de movilidad sin dolor mediante un goniómetro manual en la zona de la cadera. De este modo se valora el riesgo de lesión muscular asociado a la disminución de la flexibilidad (246).
4. **Dinamómetro manual-fuerza isométrica.** Se empleó un dinamómetro manual para valorar la fuerza desarrollada (Microfet 3; Hoogan Health Industries, Inc). Es una herramienta que

muestra entre buena y excelente reproducibilidad en un mismo testador y entre diferentes testadores (253). También tiene una buena-excelente validez para medir la fuerza isométrica en miembro inferior (254), siendo habitual su empleo en el fútbol (255). Algunos autores han propuesto que una disminución igual o superior al 10% en la pierna lesionada puede asociarse a una alteración (256).

5. **Balón-adaptación al juego.** Su valoración es fundamental durante el proceso de rehabilitación y RTP (244). Se evaluaron distintos gestos (257), que fueron divididos en tres grupos: uno de conducción y regate, otro de pase, y por último recepción y remate.
6. **Marcador de longitud-triple salto unipodal.** Se emplea el triple salto unipodal. Tras un calentamiento de 15 minutos, se realizan tres saltos unipodales hacia delante con cada pierna, con el objetivo de conseguir el máximo desplazamiento, y se comparan los resultados obtenidos. Este test se ha caracterizado como un buen predictor de la fuerza y potencia del miembro inferior en futbolistas (250).
7. **Evaluación del dolor-carrera.** Se emplea como referencia el test de sprint sobre 20 metros, que representa una aceleración máxima en un recorrido corto, algo habitual durante el juego (251, 252). Se realiza un calentamiento de 15 minutos y posteriormente 2 aceleraciones máximas, con salida desde la bipedestación y recuperación completa. Se mide con un cronómetro el tiempo empleado en cada sprint.

3.5 ESTRATEGIA DE ANÁLISIS Y TÉCNICAS ESTADÍSTICAS

La Regresión Lineal Múltiple fue el método elegido para analizar la relación entre la variable respuesta, Tiempo de Recuperación, y las variables explicativas, tanto cuantitativas como cualitativas. Este método matemático también permite evaluar las interacciones entre las variables.

Una de las principales ventajas de este tipo de modelo estadístico es su facilidad de interpretación. Por otra parte, tiene el inconveniente de ser un modelo paramétrico sujeto a condiciones y restricciones que tienen que ser tenidas en cuenta para su aplicación. En caso de no cumplirse, pueden aparecer sesgos en los resultados, con el riesgo de una interpretación errónea de los mismos.

3.5.1 Regresión Lineal Múltiple: el modelo, estimación de sus parámetros y contrastes

Un Modelo de Regresión Lineal Múltiple permite estudiar la relación entre una variable de interés Y (variable respuesta o dependiente) y un conjunto de variables explicativas (o regresoras).

En el Modelo de Regresión Lineal Múltiple se supone que la función de regresión que relaciona la variable dependiente con las variables independientes es lineal, ajustándose los datos observados a una recta. Es decir:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

Se consideró como variable dependiente el **Tiempo de Recuperación o baja deportiva (días)**, mientras que las variables explicativas fueron el Tipo de Lesión, el Producto Infiltrado, el Momento de la Infiltración (horas) y la Edad del jugador (años).

La formulación de la ecuación de la Regresión Lineal Múltiple es planteada en el anexo 3.

Requisitos para su aplicación.

A pesar de que el método de la regresión lineal múltiple está muy extendido, existe un conjunto de requisitos que se tienen que dar para que el resultado de su aplicación sea correcto. Entre esos supuestos están los siguientes:

1. Relación lineal entre la variable dependiente (días de baja deportiva) y las variables independientes.
2. Homogeneidad de varianza (homocedasticidad): el tamaño del error de predicción no tiene que cambiar significativamente entre los distintos valores de una variable independiente.
3. Variáveis explicativas linealmente independientes entre sí: las observaciones de los datos han de registrarse utilizando métodos estadísticamente válidos, y no tienen que existir relaciones ocultas entre las variables. En la regresión lineal múltiple, es posible que algunas de las variables independientes estén realmente correlacionadas entre sí, por lo que es importante verificarlas antes de desarrollar el modelo de regresión. Si dos variables independientes están muy correlacionadas ($> \sim 0,6$), solo una de ellas debe mantenerse en el modelo de regresión. En caso contrario, pueden aparecer problemas de multicolinealidad.
4. Normalidad: distribución normal de las variables cuantitativas.

Estimación de sus parámetros.

Si se dan las condiciones necesarias para su aplicación, el teorema de Gauss-Markov postula que el método de estimación de mínimos cuadrados genera unos estimadores óptimos, es decir, los

coeficientes estimados para el Modelo van a estar centrados y van a tener varianza mínima (258).

Regresión múltiple como herramienta para estimar la baja deportiva.

El modelo de regresión múltiple obtenido presentará una ecuación que relaciona la variable dependiente con las variables explicativas. Si se tienen los datos de todas las variables explicativas, es posible estimar la variable dependiente.

Regresión múltiple como herramienta para detectar causalidad.

La regresión múltiple también permite entender la relación funcional entre la variable dependiente y las variables independientes, y estudiar cuáles pueden ser las causas de la variación en la dependiente (Y). Se pretende estimar cómo cambia la baja deportiva a medida que cambia cada variable independiente, lo que supone conocer la fuerza de la relación entre ambas (causalidad).

3.5.2 Cálculo y selección de Modelos

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el entorno de programación estadístico R: “The R Project for Statistical Computing”, 2020 (259). Para la estimación de los parámetros de distintos modelos, y seleccionar aquel que mejor explique la variable respuesta, fue empleada la librería especializada en regresión lineal “olsrr” (260).

Fueron planteados una serie de modelos que pudiesen explicar los días de baja deportiva teniendo en cuenta las distintas variables estudiadas y sus interacciones (Tabla 9). Para seleccionar el modelo con mejor ajuste a los datos, se emplearon estadísticos específicos para determinar la calidad, en términos de ajuste, de cada modelo posible. Se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC: Akaike Information Criterion), el criterio de información bayesiano (BIC: Bayesian Information Criterion), y el coeficiente de determinación ajustado R^2 . También se analizaron los residuos del modelo mediante gráficos específicos.

Los modelos presentados fueron 6 (Tabla 9).

Tabla 9 - Modelos lineales obtenidos.

PrInf: Producto Infiltrado; HrIn: momento de la infiltración (horas); PrInf-HrIn: interacción entre ambos factores.

Modelo	Predictores					
1	PrInf-HrIn					
2	Ls	PrInf-HrIn				
3	Ls	PrInf-HrIn	Edad-HrIn			
4	Ls	Edad	PrInf-HrIn	Edad-HrIn		
5	Ls	PrInf	Edad	PrInf-HrIn	Edad-HrIn	
6	Ls	PrInf	Edad	HrIn	PrInf-HrIn	Edad-HrIn

El paquete “olsrr” del entorno de programación “R” permite calcular un conjunto de modelos con el fin de comparar y elegir aquel que mejor explica el Tiempo de Recuperación. La Regresión Lineal se modeló en “R” de la siguiente forma:

```
“modelo <- lm(RTP ~ PrInf + HrIn + Ls + edad + PrInf:HrIn + edad:HrIn, data = data)”
```

A continuación, se comentan los criterios empleados para elegir el Modelo final con mejor ajuste:

- **Coefficiente de determinación (R²).** Representa la proporción de la variabilidad de la variable dependiente que es explicada por la regresión.

Informa de la cantidad de variabilidad en el Tiempo de Recuperación que es explicada por las variables explicativas del Modelo. Su valor esta entre 0 y 1.

Representa la variabilidad explicada por el modelo, medida como suma de cuadrados (desviación con respecto a la media). Indica la distancia de los datos a la línea de regresión ajustada, reflejando la bondad del ajuste del Modelo al Tiempo de Recuperación. Presenta el inconveniente de aumentar siempre que aumenta el número de variables explicativas, pero esto ocurre independientemente de su relevancia para el Modelo.

- **El R² ajustado,** por su parte, refleja el poder explicativo de un modelo sobre la variabilidad de la variable dependiente, penalizando el número de variables independientes (número de grados de libertad). Al estar ajustado al número de predictores que existen en el modelo, permite comparaciones entre distintos modelos. Aumenta si cada nuevo término mejora el modelo más de lo esperado por casualidad, y disminuye si mejora el modelo menos de lo esperado por casualidad.

- **Criterio de información de Akaike (AIC).** El modelo de mejor ajuste según Akaike (261), es aquel que explica la mayor cantidad de variación de la variable dependiente utilizando la menor cantidad de variables independientes posibles. Este criterio no ofrece un dato absoluto de calidad, sino que ofrece una medida para comparar diferentes modelos entre sí. Valores más pequeños de AIC implican mejor ajuste.
- **Error final de predicción.** Se refiere al error que existe entre el dato real y el predicho por el modelo. Por lo tanto, valores menores implican menor error de predicción.
- **Grado de parsimonia.** Un modelo es más parsimonioso (simple y probable) en la medida que emplea menos variables dependientes.

En base a estos criterios, se propuso el modelo nº 4 como el **modelo más adecuado para explicar el tiempo de recuperación del deportista tras la lesión** (ver apartado 4.2.1: fuentes de variación en la baja deportiva; Tabla 15: resultado del proceso de selección de Modelos).

4 RESULTADOS

DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para determinar la relación entre aplicar PRP Puro en la lesión muscular aguda y el Tiempo de Recuperación, y siguiendo el Modelo Teórico de Investigación propuesto, se presentan el análisis de los datos registrados y los resultados divididos en tres partes:

- 1. Variables y estadísticos descriptivos.**
- 2. Modelo Predictivo del Tiempo de Recuperación.**
- 3. Importancia de cada factor del modelo en el Tiempo de Recuperación.**

En los apartados siguientes se realiza la discusión de los resultados y la exposición de las conclusiones. En base a estos apartados, en el capítulo de discusión se propone un protocolo de uso de PRP en el tratamiento de la lesión muscular (apartado 5.3).

4.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA: VARIABLES Y ESTADÍSTICOS

De los 40 jugadores de fútbol participantes, a 20 se les infiltro con PRP Puro, y a los otros 20, el grupo control, con un producto homeopático (Traumeel). En todos los jugadores se analizaron las variables tipo de Lesión (Ls), Producto Infiltrado (PrInf), Momento de la infiltración (HrIn), Edad y Tiempo para la recuperación (Tabla 10).

*Tabla 10 - Descripción de las variables del estudio.
Ls: Lesión; PrInf: Producto Infiltrado; HrIn: Momento de la infiltración (horas).*

Variable	Tipo	Descripción	Unidad	Valores	Dependencia
Ls	Cualitativa	Tipo de lesión	NA	Miofascial / UMT	Independiente
PrInf	Cualitativa	Producto aplicado	NA	PRP Puro/ Homeo	Independiente
HrIn	Cuantitativa	Momento de la infiltración	Horas	Rango variable	Independiente
Edad	Cuantitativa	Edad	Años	Rango variable	Independiente
RTP	Cuantitativa	Días de baja deportiva	Días	Rango variable	Dependiente

4.1.1 El producto infiltrado y la lesión

4.1.1.1 PRP Puro, homeopatía y baja deportiva.

Al valorar el tipo de tratamiento aplicado en relación con la baja deportiva de cada jugador, se observó diferencia en el tiempo medio de recuperación entre los grupos: 27,2 días en el grupo de PRP Puro y 32,6 días en el grupo control. Esta diferencia de 5,4 días no fue significativa ($p = 0,09$), aunque pudiera tener relevancia desde un punto de vista práctico. En cualquier caso, representa una visión simplificada de la relación entre el Producto y el Tiempo de Recuperación, sin considerar posibles interacciones entre las variables, o la importancia relativa de cada una de ellas en la baja deportiva.

A continuación, se presenta la diferencia de los valores estadísticos básicos entre los valores de Tiempo de Recuperación (días) y el tipo de Producto aplicado (Tabla 11), y la diferencia entre las medias de la baja deportiva en relación con el producto empleado, con los intervalos de confianza asociados (Figura 23).

Tabla 11 - Estadísticos del Tiempo de Recuperación en función del producto infiltrado.

Estadístico	Tiempo de Recuperación	
	PRP Puro	Homeopatía
Media	27,2	32,6
Error típico	1,5	2,8
Mediana	25,5	30
Moda	24	30
Desviación estándar	6,5	12,4
Varianza de la muestra	42,5	154,3
Curtosis	-0,42	3,99
Coefficiente de asimetría	0,65	2,01
Rango	22	48
Mínimo	18	20
Máximo	40	68
Muestras	20	20

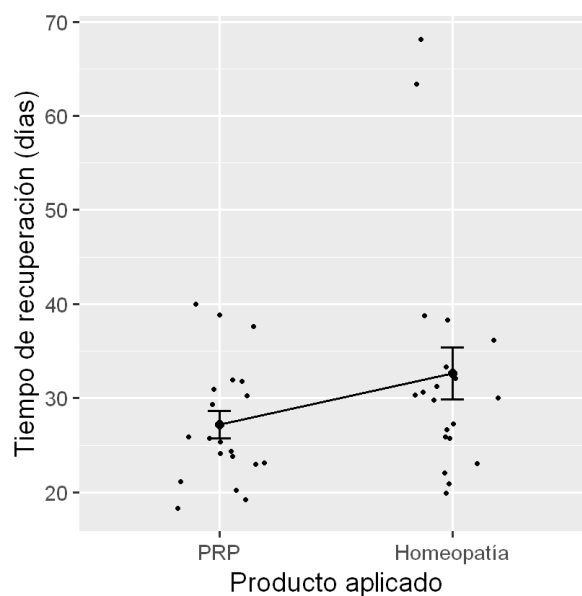


Figura 23 - Tiempo de recuperación y producto aplicado.

4.1.1.2 Tipo de lesión.

Los tipos de lesiones en los músculos isquiotibiales fueron miofascial, intramuscular y de la unión miotendinosa (UMT). Las lesiones fueron distribuidas en dos grupos, en función de la afectación del tejido conectivo y su pronóstico (ver apartado 1.2.3):

- Lesiones intramusculares y miofasciales: grupo I. Tienen mejor pronóstico. Para simplificar su designación, fue denominado grupo de lesiones musculares miofasciales.
- Lesiones de la UMT: grupo II. Tienen peor pronóstico.

De los 40 jugadores, 19 de ellos presentaban lesiones musculares miofasciales o intramusculares, y los 21 restantes presentaban la lesión en la unión miotendinosa (UMT).

Tipo de Lesión y Baja Deportiva

También se observaron diferencias en el tiempo medio de recuperación tras la aplicación del tratamiento dependiendo del tipo de lesión, siendo 25,7 días en el grupo de las lesiones intramusculares y miofasciales (p -valor=0,026) y 33,8 días en el grupo de las lesiones de la UMT (p -valor = 0,054). Estos datos de significación son el resultado preliminar que se obtiene al llevar a cabo un ANOVA de un factor. Orientan a que el tipo de lesión va a ser un factor significativo en el Modelo de Regresión posteriormente calculado. A continuación, se muestra la diferencia de los valores estadísticos básicos entre los valores de Tiempo de Recuperación en función del tipo de Lesión (tabla 12), y el gráfico de diferencia de medias con los intervalos de confianza (Figura 24).

Tabla 12 - Estadísticos de Tiempo de Recuperación en función del tipo de lesión

Estadístico	Tiempo de Recuperación	
	Miofascial	UMT
Media	25,7	33,8
Error típico	1,2	2,6
Mediana	25	30
Moda	26	30
Desviación estándar	5,4	12,0
Varianza de la muestra	29,0	143,2
Curtosis	-0,11	3,70
Coefficiente de asimetría	0,67	1,89
Rango	20	48
Mínimo	18	20
Máximo	38	68
Muestras	19	21

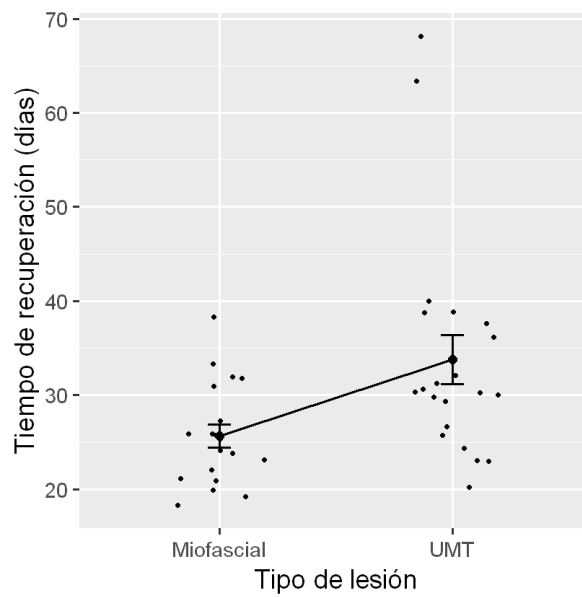


Figura 24 - Tiempo de recuperación y tipo de lesión

Tipo de Lesión y Producto infiltrado.

La distribución del tipo de lesión en el grupo de intervención y en el grupo control puede observarse en la Tabla 13.

Tabla 13 - Distribución del tipo de lesión entre grupos.
Grupo INT: grupo intervención. Grupo CON: grupo control. UMT: unión miotendinosa

TIPO DE LESIÓN					
Grupo	Miofascial		UMT		Total
INT	11	27,5%	9	22,5%	20
CON	8	20,0%	12	30,0%	20
Total	19		21		40

Esta distribución se puede ver de forma gráfica en la Figura 25.

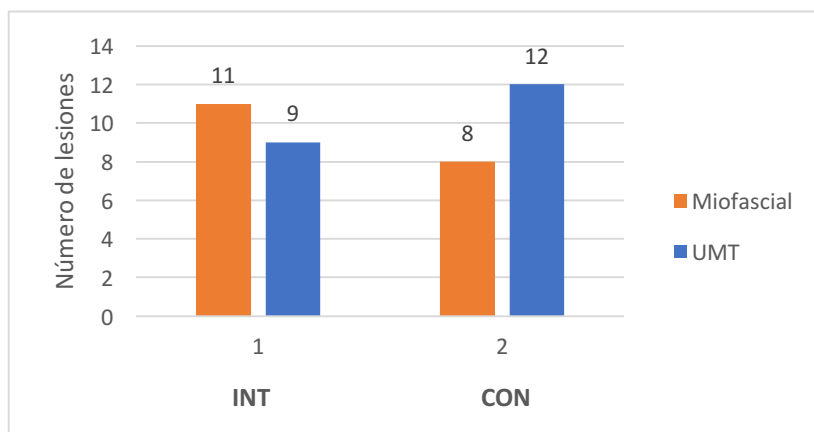


Figura 25 - Distribución de lesiones por grupo.
INT: intervención. CON: control. UMT: unión miotendinosa

4.1.2 Edad, Momento de la Infiltración y Tiempo de Recuperación

I. Estadísticos descriptivos de cada variable (análisis univariado).

La Edad media de los jugadores fue 25 años, con un intervalo desde los 18 a los 39 años.

El Momento de la infiltración representa el tiempo transcurrido desde que se produce la lesión hasta que se infiltra el producto, y fue registrado en horas. El Momento promedio de la infiltración fue de 53,7 horas

El Tiempo de Recuperación, Baja Deportiva o tiempo para la vuelta al juego, se registró como los días transcurridos desde la lesión hasta el día que el paciente estuvo disponible para la vuelta al entrenamiento o la competición sin restricción. El tiempo medio global de recuperación fue de 29,93 días (Tabla 14).

Tabla 14 - Estadísticos descriptivos de la Edad, el Momento y el Tiempo de Recuperación.

<i>Estadístico</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Momento de aplicación (horas)</i>	<i>Tiempo de recuperación (días)</i>
Media	25,0	53,7	29,9
Error típico	0,7	4,1	1,6
Mediana	24,5	48,7	28,0
Moda	23	44	30
Desviación estándar	4,7	25,8	10,2
Varianza de la muestra	21,9	668,3	103,5
Curtosis	0,6	1,4	6,3
Coeficiente de asimetría	0,8	1,3	2,2
Rango	21	104,5	50
Mínimo	18	18	18
Máximo	39	122	68
Suma	1000,0	2147,5	1197,0
Muestras	40	40	40

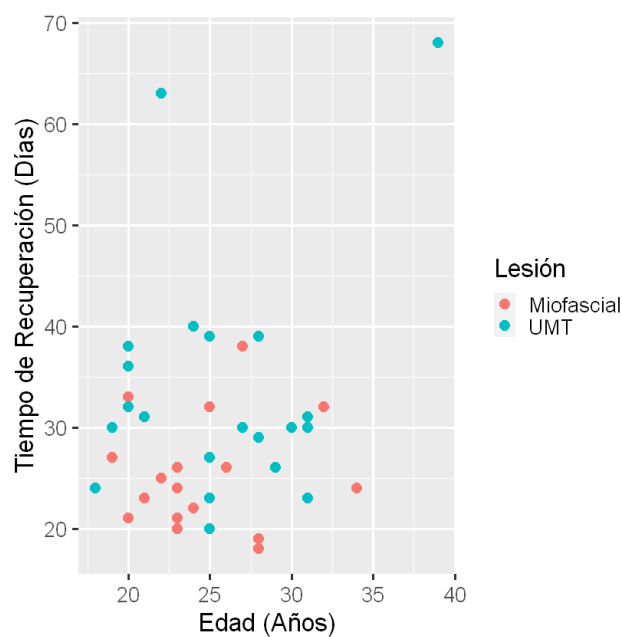
La distribución de estas variables continuas, junto con el análisis de normalidad, son presentados en el Anexo 2. De manera breve, cabe indicar que la variable **Edad** sigue una distribución normal de los datos. Por otro lado, la variable **Momento de infiltración** no sigue un patrón normal de distribución de los datos, según los histogramas y los diagramas de densidad de probabilidad. Y por último, el **Tiempo de Recuperación** presenta una distribución muy aproximada a la normalidad. Mediante el test de Shapiro-Wilk, se deduce que no sigue una distribución normal, pero el gráfico QQ Plot indica que esa falta de normalidad es pequeña. Muchos de los puntos de la muestra están sobre la recta de referencia (anexo 2, ilustración 9). Por lo tanto, se decide proseguir el análisis, dado que no se espera que esta falta de normalidad presente problemas en el Modelo estadístico. Esta decisión se volverá a revisar en la fase de validación del Modelo (apartado 4.2.8).

II. Edad-Baja deportiva y Momento de infiltración-Baja deportiva, para cada tipo de lesión (análisis bivariado).

A continuación, se representa la relación entre la Edad y el Tiempo de Recuperación para cada tipo de lesión, independientemente del producto aplicado (Figura 26).

También se representa la relación entre el Momento de la Infiltración y el Tiempo de Recuperación, para cada tipo de lesión, de manera independiente al producto aplicado

La primera conclusión que se puede obtener con los gráficos de dispersión del Tiempo de Recuperación en función de la Edad y del Momento de infiltración es que no se aprecia ninguna forma geométrica que sugiera algún tipo de relación. No existe una relación evidente entre la Edad y el Tiempo necesario para el regreso a la actividad deportiva. De manera similar, no se observa una clara relación directa entre el Momento de la Infiltración y el Tiempo de Recuperación.



4.1.3 Influencia de los valores extremos en la baja deportiva

Un valor extremo, también llamado “outlier”, es una observación que tiene un valor atípico respecto al resto de los datos de la muestra. Normalmente es un valor mucho mayor que el resto. Antes de llevar a cabo el proceso de inferencia, se analizó si existían valores extremos y hasta qué punto podían sesgar el resultado del análisis.

Del análisis de las representaciones gráficas, mediante la visualización de los diagramas de cajas, se obtuvieron indicios de que pudiera haber dos valores de Tiempo de Recuperación que podrían ser considerados como extremos (Figura 28 y Figura 29).

Para considerar un valor como posible sesgo, se establecen unos límites superior e inferior fuera de los cuales se podría considerar como tal. Se determina Q1 como el valor del primer cuartil (25%), Q3 el tercer cuartil (75%) y el rango intercuartílico o IQR, la diferencia entre el primer y el tercer cuartil (Q3-Q1). Como margen inferior, se fija el primer cuartil menos 1.5 veces el rango intercuartil: $Q1 - 1.5 \times IQR$. Como margen superior, se consideró el tercer cuartil más 1.5 veces el rango intercuartil: $Q3 + 1.5 \times IQR$.

Ambos valores de baja deportiva se encuentran por debajo del límite superior fijado, por lo que se mantuvieron dentro del estudio hasta la fase de diseño del modelo estadístico. Posteriormente, se analizó si suponían algún problema de ajuste o implicaban alguna dificultad para interpretar el modelo. Los valores correspondían a dos casos en los que se empleó homeopatía. En un caso, el paciente tuvo una recidiva en un entrenamiento, antes de recibir el alta médica, con lo que la baja deportiva se alargó hasta un total de 68 días. Su edad era de 39 años, la lesión de tipo UMT, el producto homeopatía, y el momento de infiltración a las 96 horas desde la lesión y a los 9 días. En el otro caso, con baja deportiva de 63 días, se trataba de un jugador de 22 años, con una lesión en la UMT, infiltrado con homeopatía transcurridas 50 horas y 9 días desde la lesión.

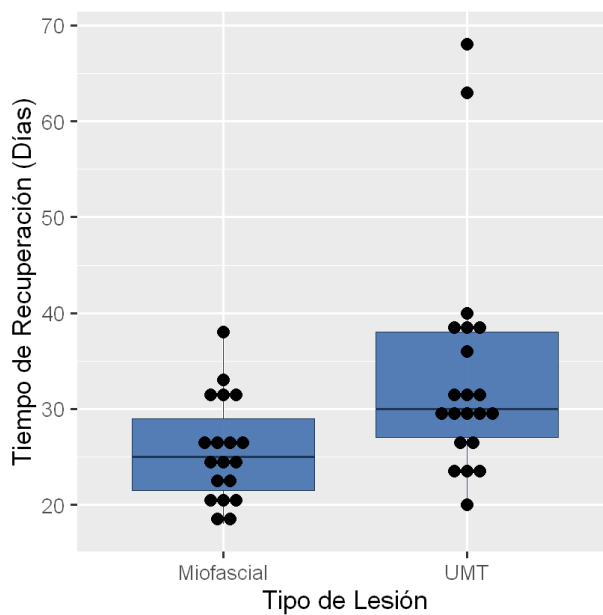


Figura 28 - Tiempo de Recuperación (días) y Tipo de Lesión.

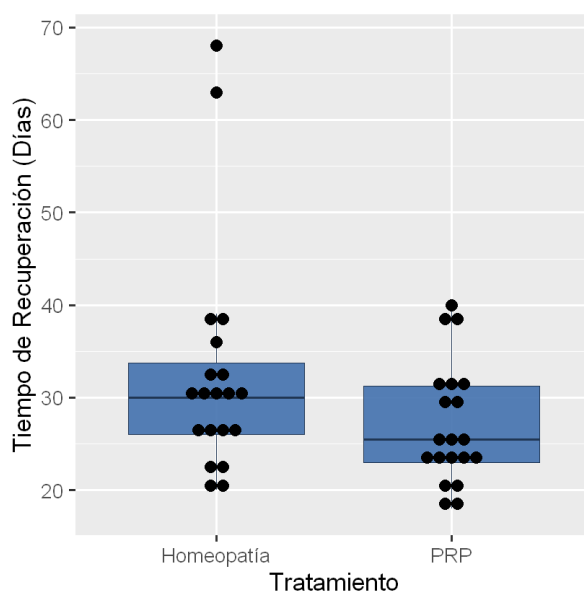


Figura 29 - Tiempo de Recuperación (días) y Producto aplicado.

4.1.4 Recidivas

Se registraron un total de 6 recidivas: 3 en el grupo INT y 3 en el grupo CON. Por lo tanto, no se observaron diferencias entre grupos, y el porcentaje de recidivas en cada grupo (15%), fue parecido al encontrado en otras publicaciones (23). Es necesario un número superior de participantes para valorar posibles diferencias de las recidivas entre los grupos.

4.2 MODELO PREDICTIVO DEL TIEMPO DE RECUPERACIÓN

A continuación, se describe el modelo estadístico en detalle, su ajuste en función de la muestra empleada, las condiciones que permiten llevar a cabo la inferencia estadística, y la valoración de las hipótesis de la investigación de acuerdo con los resultados del modelo calculado.

4.2.1 Fuentes de variación en la Baja Deportiva

Las variables explicativas consideradas en el estudio fueron seleccionadas en base a su posible efecto sobre el Tiempo de Recuperación. Tal y como fueron expuestas en el modelo teórico de investigación (apartado 2.3), se incluyó como variable dependiente al Tiempo de Recuperación, y **cuatro variables explicativas**: el Producto Infiltrado, el Tipo de Lesión, la Edad de paciente, el Momento de la Infiltración, y **dos interacciones significativas**: Producto-Momento y Edad-Momento. Por lo tanto, fueron consideradas en total 6 posibles fuentes de variación.

El análisis de los datos fue mediante regresión lineal múltiple, que posibilita conocer la relación entre la variable respuesta y las variables explicativas, además de permitir evaluar las interacciones entre variables (apartado 3.5.1). Fueron planteados varios modelos para explicar los días de baja deportiva, y se utilizaron estadísticos específicos para determinar la calidad, en términos de mejor ajuste, de cada modelo posible (apartado 3.5.2; Tabla 9).

El cálculo final de modelos y sus resultados se muestra en la Tabla 15. Como se puede observar, el modelo nº 4 obtuvo mayor valor de R^2 ajustado, menor AIC, menor Error de predicción y además, es el modelo más parsimonioso (menor número de variables) entre los que tienen los mejores parámetros. Por lo tanto, fue seleccionado como el Modelo más adecuado para explicar el Tiempo de Recuperación del deportista tras la lesión muscular.

Tabla 15 - Resultado del proceso de selección de Modelos

Modelo	R^2	R^2 Ajustado	AIC	Error predicción
1	0,1913	0,1476	297,59	92,64
2	0,3237	0,2674	292,44	81,52
3	0,3992	0,3305	289,71	76,23
4	0,4862	0,4107	285,45	68,62
5	0,4971	0,4057	286,59	70,75
6	0,4971	0,4057	286,59	72,28

Este Modelo Final obtenido presenta **4 fuentes de variación** de la baja deportiva: 2 variables independientes y 2 interacciones:

Tipo de Lesión, Edad, Momento-Producto, Momento-Edad.

Las interacciones indican que el efecto de un factor depende del valor del otro. Por lo tanto, se debe considerar el registro del Momento de la infiltración con un nivel alto de detalle (horas transcurridas), y también la Edad de cada jugador.

4.2.2 Formulación del Modelo

En el modelo de regresión lineal múltiple se supone que la función de regresión que relaciona la variable dependiente con las variables independientes es lineal, es decir:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

- β_0 es el **término independiente**. Es el valor esperado de Y cuando X_1, \dots, X_n son cero.
- $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ son los **coeficientes parciales** de la regresión:
 - β_1 mide el cambio en Y por cada cambio unitario en X_1 , manteniendo X_2, X_3, \dots, X_n constantes.
 - β_2 mide el cambio en Y por cada cambio unitario en X_2 , manteniendo X_1, X_3, \dots, X_n constantes.
 - β_n mide el cambio en Y por cada cambio unitario en X_n , manteniendo X_1, \dots, X_{n-1} constantes.
- ϵ : es el error de observación debido a variables no controladas.

También se analiza el efecto que tiene sobre el Tiempo de Recuperación la interacción entre las variables independientes. En este caso, el Modelo de Regresión Lineal Múltiple tomará la siguiente forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

En esta formulación se puede apreciar que el efecto de X_1 sobre el Tiempo de Recuperación (y) ya no será constante, sino que dependerá también de su interacción con X_2 . Esto se aprecia mejor transformando la ecuación de la siguiente forma:

$$y = \beta_0 + (\beta_1 + \beta_3 X_2) X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \epsilon$$

Se plantea el modelo de regresión con la información obtenida de la muestra. Se asume que los errores en las observaciones tienen distribución normal de media cero y varianza σ^2 , y que son independientes entre sí. Las variables explicativas son linealmente independientes entre sí.

El objetivo es obtener **estimadores** a partir de la muestra:

- De los coeficientes $\beta_0, \beta_1, \beta_2$
- De la varianza del error σ^2

Se aplica el método de mínimos cuadrados, para obtener los estimadores.

La variabilidad total de la variable dependiente Y es la variabilidad explicada (VE) + variabilidad no explicada por la regresión (VNE).

- $VT = VE + VNE$

La descomposición de la variabilidad se representa en una tabla ANOVA (tabla ancova cuando se hace el tratamiento conjunto de variables cuantitativa y cualitativas).

4.2.3 Parámetros estimados en el Modelo de Regresión Lineal Múltiple

Inferencia sobre los parámetros del modelo.

Para encontrar el mejor ajuste de cada variable independiente, el Modelo de Regresión Lineal Múltiple calcula **los parámetros característicos del Modelo**: los coeficientes de regresión y su p-valor, el estadístico F y el p-valor general, y el coeficiente de determinación R^2 junto con su versión ajustada (Tabla 16).

1. **Los coeficientes de regresión** que conducen al menor error general del modelo. Cada coeficiente mide la intensidad de la relación entre el Tiempo de Recuperación y la variable independiente con la que se asocia, modelando su relación lineal y posibilitando la realización de los cálculos de las ecuaciones de regresión. El modelo presentado tiene un coeficiente por cada factor.

El coeficiente Intercepto es un valor constante en el Modelo. Representa el valor promedio del Tiempo de Recuperación si todas las variables independientes fueran cero. Como su p-valor es 0,0014 ($\ll 0.05$), la probabilidad de que el intercepto sea cero es mucho menor al 5%.

2. **El p-valor** asociado a cada coeficiente de regresión. Representa la probabilidad de que el coeficiente de regresión sea cero. El nivel de significación obtenido para cada coeficiente de regresión fue menor a 0,05, lo que indica que la probabilidad de que el coeficiente de las variables independientes sea cero es menor del 5%. Los intervalos de confianza no contienen el valor cero.
3. **El estadístico F y el p-valor general del modelo.** Este estadístico nos informa de la bondad del ajuste global del modelo. Es un aspecto complementario a los coeficientes de regresión de cada variable independiente.

4. **El coeficiente de determinación R^2 .** Informa sobre la proporción de la variabilidad del Tiempo de Recuperación que es explicada por las variables independientes incluidas en el Modelo. Este coeficiente refleja la bondad del ajuste del Modelo a la variable Tiempo de Recuperación. **El R^2 ajustado** penaliza el número de variables explicativas que se incluyen en el modelo de regresión.

Tabla 16 - Parámetros estimados en el Modelo de Regresión Lineal Múltiple.

Variable	Coficiente regresión	Error estándar	t-valor	p-valor	Intervalo de confianza (2,5%)	Intervalo de confianza (97,5%)	
Intercepto	β_0	65,02	18,62	3,49	0,0014**	27,18	102,85
Ls(UMT)	β_1	7.88	2,57	3,06	0,0043**	2,65	13,11
Edad	β_2	-1,70	0,71	-2,40	0,0220*	-3,15	-0,26
PrInf(homeo):HrIn	β_3	-0,66	0,28	-2,33	0,0261*	-1,24	-0,08
PrInf(PRP):HrIn	β_4	-0,77	0,27	-2,80	0,0084**	-1,32	-0,21
Edad:HrIn	β_5	0,03	0,01	3,08	0,0041**	0,01	0,05

Nivel de significación: ** (99%), *(95%)

Error estándar residual: 7.81 en 34 grados de libertad

R^2 : 0.4862, R^2 Ajustado: 0.4107

Estadístico F: 6.436 en 5 y 34 grados de libertad, p-valor: 0.000262

Las ecuaciones empleadas en el cálculo del modelo de regresión lineal múltiple se encuentran en el anexo 3. La ecuación final presentada fue la siguiente:

$$rtp = 65,02 - 1,7 * Edad + 7,88 * Ls(UMT) - 0,66 * PrInf(Homeo) * HrIn - 0,77 * PrInf(PRP) * HrIn + Edad * HrIn$$

Dónde: RTP: Tiempo de recuperación (baja deportiva). Ls: Tipo de lesión (si el tipo de lesión en la ecuación es miofascial/intramuscular, este término sería cero). PrInf: Producto infiltrado. HrIn: Momento de infiltración

Inicialmente se plantea una única ecuación de regresión, y se divide en cuatro ecuaciones, que permiten conocer los efectos de las variables seleccionadas en el Modelo sobre la baja deportiva.

Los parámetros finales obtenidos mediante el análisis de regresión, junto con los puntos singulares asociados a las interacciones (apartado 4.2.7), permiten valorar y comprender el efecto de las variables explicativas sobre la baja deportiva.

4.2.4 Marco Teórico Final de la Investigación

A continuación, se presentan los resultados del modelo de regresión obtenido, en base a la hipótesis principal y las secundarias, y al Modelo Teórico de Investigación planteado (apartado 2.3). A diferencia de cómo se planteó en un principio el modelo de la investigación (Figura 20), se separó el efecto del producto en dos relaciones, por ser una variable categórica con dos niveles: PRP Puro y Homeopatía (Figura 30).

Establecido el Modelo Teórico de Investigación, se emplean los coeficientes de cada factor y su significación estadística para valorar las hipótesis. A continuación, se realizará el contraste de las hipótesis planteadas.

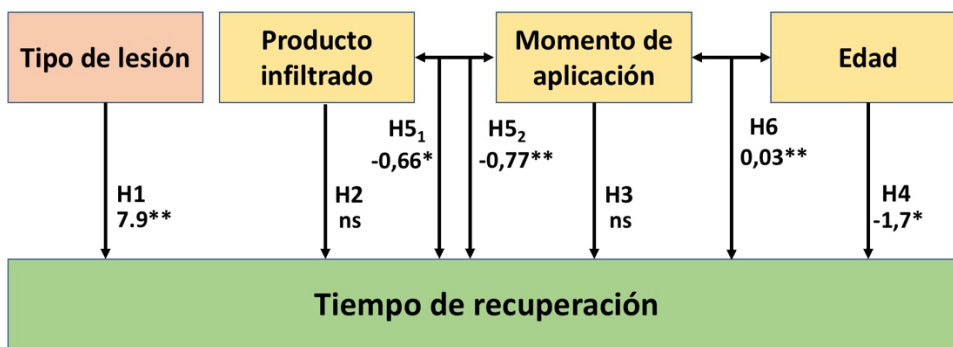


Figura 30 - Modelo Teórico final de la Investigación.

Coefficientes de cada factor y su significación estadística. Nivel de significación: ** 99%, * 95% y ns (no significativo).

4.2.5 Baja Deportiva

El Modelo de Regresión Lineal obtenido ajusta los datos a una recta, y el estadístico F informa sobre ese ajuste global del Modelo. Se puede entender como la capacidad predictiva que tienen el conjunto de factores que aportan variabilidad en la baja deportiva. Para valorar esa influencia del conjunto de factores se realizan los **contrastes de la regresión**.

Tal y como se presentó en la fase de diseño del modelo teórico de la investigación, la hipótesis principal fue:

“El conjunto de factores analizados modifica los días de baja deportiva asociados a las lesiones musculares agudas de isquiotibiales en los futbolistas”.

El contraste de hipótesis que se plantea es:

- H₀: El modelo no explica globalmente el Tiempo de Recuperación.
- H_A: El modelo explica globalmente el Tiempo de Recuperación.

El p-valor del modelo asociado al estadístico F obtuvo un valor de 0,0003, por lo que se rechazó la hipótesis nula. En consecuencia, se deduce que existe una asociación entre los factores de variabilidad estudiados y el Tiempo de Recuperación. El modelo tiene, en la medida que explica esa variabilidad, capacidad predictiva sobre el Tiempo de Recuperación: **regresión múltiple como herramienta para la estimación de la baja deportiva.**

Resultado 1:

Las fuentes de variabilidad analizadas (tipo de Lesión, Edad y las interacciones Producto-Momento y Edad-Momento) explican el 49% de la variabilidad en la baja deportiva, medida en suma de cuadrados ($R^2 = 0,49$, con $p=0,0003$).

Fueron comprobados los supuestos que han de cumplirse para poder emplear el Modelo de Regresión Lineal (apartado 4.2.8). Es posible concluir que el Modelo obtenido cumple con las condiciones necesarias para poder llevar a cabo el proceso de inferencia estadística a través de los parámetros del mismo.

Por último, se comprobó que la potencia estadística del modelo es alta (0.999), teniendo en cuenta el tamaño muestral (40 jugadores), el nivel de error admitido ($\alpha=0.05$) y el tamaño del efecto del conjunto de las variables explicativas sobre el Tiempo de Recuperación ($f^2=0.946$) (apartado 4.3). Esta potencia alta indica que la muestra de futbolistas ($n=40$) es representativa de la población de deportistas federados, y permite inferencia estadística.

4.2.6 Baja Deportiva y las variables independientes.

A continuación, se analiza la relación de cada una de las cuatro variables explicativas con la Baja Deportiva. Suponiendo que se cumple el modelo de regresión lineal múltiple, interesa determinar qué fuentes de variación (variables e interacciones) son significativas para explicar la baja deportiva. El Modelo obtenido tiene capacidad de detectar diferencias entre grupos, para lo que se realiza el contraste de hipótesis individuales sobre los coeficientes: **regresión múltiple como herramienta para detectar causalidad.**

4.2.6.1 El tipo de Lesión modifica la Baja Deportiva.

El tipo de lesión se consideró una variable cualitativa binaria (miofascial/intramuscular y UMT). Al realizar una regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de regresión de 7,9 asociado a la Lesión UMT, mientras que la Lesión miofascial/intramuscular se representó con un coeficiente de cero. Esto significa que la lesión de la UMT implica en promedio 7,9 días más de Tiempo de Recuperación que la lesión miofascial/intramuscular. Su p-valor fue 0.0043, y su intervalo de confianza excluye el cero. En consecuencia, esta variable se mantuvo en el modelo.

- *Hipótesis 1: el tipo de Lesión modifica la baja deportiva. Aceptada.*

En base a los resultados expuestos, el tipo de lesión ejerce influencia sobre la baja deportiva.

Resultado 2:

La lesión de la Unión Miotendinosa (UMT) tiene peor pronóstico que la intramuscular y la miofascial. En igualdad de Producto, Momento de la infiltración y Edad, la baja deportiva es superior en $7,9 \pm 5,2$ días (IC 95%; 2,6-13,1; $p=0,0043$).

4.2.6.2 El tipo de Producto.

No se encontraron diferencias significativas entre productos en la baja deportiva, al no considerarse en relación con el factor Momento de Infiltración.

En el análisis descriptivo se observaron directamente las variables estudiadas y el tiempo de recuperación, sin considerar las interacciones. Se obtuvieron diferencias en función del tipo del tratamiento aplicado: $27,2 \pm 6,5$ días cuando se les administró PRP Puro y $32,6 \pm 12,4$ días en el caso del tratamiento homeopático. Estas diferencias no fueron significativas (p valor= 0,09). Por lo tanto, el producto infiltrado no obtuvo una significación estadística suficiente para mantenerse en el Modelo general como variable independiente.

Para confirmar si existían diferencias significativas entre el Tiempo de Recuperación de los pacientes tratados con PRP Puro y los que fueron tratados con el producto homeopático, se llevó a cabo el test no paramétrico de Mann–Whitney–Wilcoxon, ya que la variable tiempo de recuperación no sigue una distribución normal. El resultado del test fue $Z = 1.5313$, p -valor = 0.1284. Como el p -valor > 0.05 , no es posible rechazar la hipótesis nula en un contraste de hipótesis:

- H_0 : No existen diferencias significativas en el tiempo de recuperación entre los dos tratamientos (igualdad entre productos).
- H_A : Si existen diferencias significativas en el tiempo de recuperación entre los dos tratamientos.

Por lo tanto, se concluyó que no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de recuperación entre deportistas a los que se les aplicó un tratamiento distinto, sin valorar las posibles interacciones.

La hipótesis 2 fue planteada de la siguiente manera:

- *Hipótesis 2: el tipo de producto infiltrado modifica la baja deportiva, independientemente de cuando se infiltra.* Rechazada.

Este resultado confirmó la ausencia de la variable Producto de manera aislada en el Modelo de Regresión Lineal Múltiple seleccionado. Para obtener diferencias significativas entre los productos, habrá que considerar la interacción Producto-Momento (apartado 4.2.7.1).

4.2.6.3 Momento de la infiltración.

Tampoco obtuvo la suficiente significación estadística para mantenerse en el modelo como variable independiente. Por esta razón, el modelo seleccionado no la contiene.

- *Hipótesis 3: el Momento de la infiltración modifica la baja deportiva, con independencia del tipo de producto o la edad. Rechazada.*

El Momento de Infiltración, por sí solo, no es sinónimo de disminución en la baja deportiva. Es necesario tener en consideración sus dos interacciones: Producto-Momento y Momento-Edad. (apartado 4.2.7).

4.2.6.4 La Edad modifica la Baja Deportiva.

La Edad presentó un coeficiente de regresión de -1,7. Su “interpretación estricta” es que el tiempo de recuperación podría disminuir en promedio 1,7 días por cada año que aumente la edad, si el resto de términos de la ecuación fueran cero. Su p-valor es significativo (0.0220) y su intervalo de confianza excluye el cero (Tabla 16). Se considera que la Edad puede influir en el tiempo de recuperación. Por lo tanto, esta variable se puede mantener en el modelo.

- *Hipótesis 4: la Edad del jugador modifica la baja deportiva, independientemente de cuando se realiza la infiltración. Aceptada*

Mantener la Edad como variable independiente se discutirá posteriormente. Al existir una interacción Momento-Edad (ver apartado 4.2.7.2), parece lógico estudiar la Edad de manera conjunta con el Momento.

4.2.7 Baja Deportiva explicada por el Momento de Infiltración en relación con el Producto y con la Edad

Las interacciones estudiadas obtuvieron coeficientes de regresión significativos. Tanto Producto-Momento como Momento-Edad tienen efecto sobre los días de baja deportiva.

Para comprender el efecto de cada Producto en la baja deportiva en función del Momento de la infiltración, o la relación entre la Edad y el Momento, a partir de las ecuaciones del modelo se obtuvieron un conjunto de **puntos singulares del Modelo**. En estos puntos característicos, uno de Momento y dos de Edad, la baja deportiva se mantiene constante (un valor de edad para cada producto). De su análisis, se pueden extraer conclusiones que ayuden a la optimización del uso del PRP Puro en la Regeneración de la lesión muscular.

4.2.7.1 Interacción Producto-Momento.

La interacción Producto-Momento actúa como fuente de variación de la baja deportiva dentro del Modelo. Tanto para el PRP Puro como para la Homeopatía se obtuvieron coeficientes de regresión con significación estadística. Coeficiente del PRP Puro= -0,77, p-valor= 0,0084; Coeficiente de la Homeopatía= -0,66, p-valor= 0,0261.

El efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración (el Momento modifica el efecto de cada Producto). En consecuencia, las dos variables Producto y Momento se deben estudiar de forma conjunta (interacción significativa).

- *Hipótesis 5₁: El efecto del PRP Puro en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración. Aceptada.*
- *Hipótesis 5₂: El efecto de la homeopatía en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración. Aceptada.*

Resultado 3:

El efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración (PRP Puro-Momento (p=0,0084) y Homeopatía-Momento (p=0,0261).

El objetivo fue determinar el efecto del Producto en función del Momento de aplicación. Es decir, cómo se modifica la Baja Deportiva con cada producto al variar el Momento de la infiltración.

I. Baja Deportiva constante para cualquier Edad.

Para obtener el punto singular del Momento, se derivaron las ecuaciones del Tiempo de Recuperación en relación a la Edad, se igualaron a cero y se despejó el momento, y se obtuvo el punto singular de Momento de infiltración con baja deportiva constante (ver anexo 3, apartado 3.1).

Se obtuvo un punto de **baja deportiva constante** para el Momento de infiltración de **55 horas**. Este valor singular del Momento no varía ni con distintos tratamientos ni con distintas lesiones.

- Infiltración precoz. Cuando el momento de la infiltración es antes de las 55 horas, la baja deportiva disminuye. Esta disminución es mayor a medida que crece la edad del deportista.

Con la infiltración precoz, la baja deportiva estimada es favorable para los veteranos con ambos productos (PRP Puro y homeopatía).

- Infiltración diferida. Cuando el momento de la infiltración es después de las 55 horas, la baja deportiva aumenta para los “veteranos”. Este aumento es mayor a medida que aumenta la edad del deportista.

Con la infiltración diferida de PRP Puro, la baja deportiva estimada es favorable para los jóvenes. Con la infiltración diferida de Homeopatía, la baja deportiva estimada no es favorable (ni en jóvenes ni en veteranos). Aumenta de forma acusada en los veteranos.

Se consideran infiltración precoz e infiltración diferida a aquellas que se encuentra en el límite inferior y superior del periodo en el que se realizaron la mayor parte de las infiltraciones: a las 24 horas transcurridas desde la lesión (precoz), y a las 72 horas (diferida).

En resumen:

La infiltración precoz fue favorable para los veteranos, con el uso de ambos productos (PRP Puro y homeopatía).

La infiltración diferida fue favorable para los jóvenes, con el uso de PRP Puro.

Por lo tanto, para disminuir la baja deportiva es necesario considerar de manera conjunta el Producto y el Momento de su infiltración.

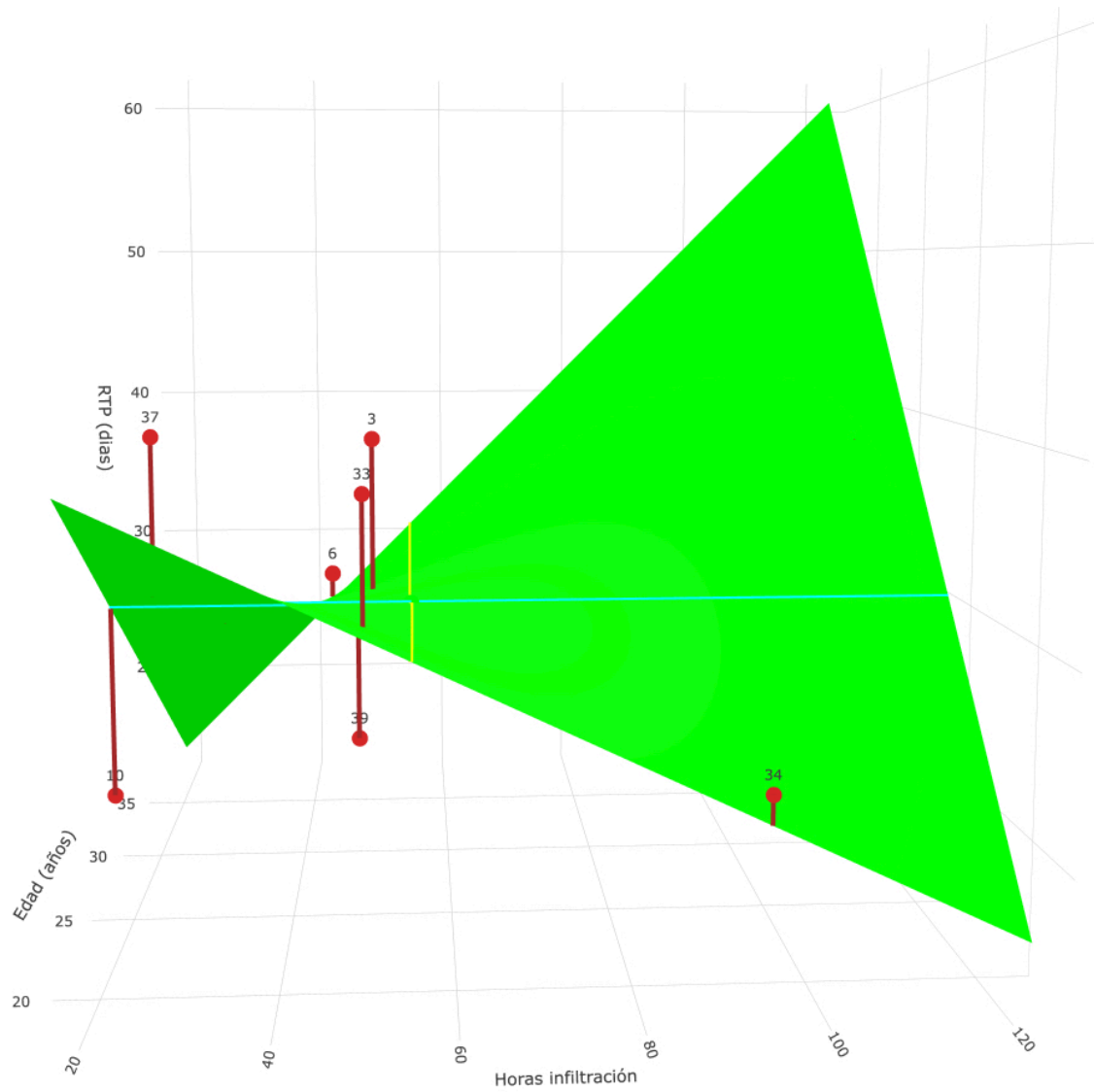


Figura 31 - Punto singular del Momento según el Modelo, empleando PRP Puro en lesiones de la UMT. En el momento de 55 horas (línea amarilla), la baja deportiva se mantiene constante, con independencia de la Edad. Con una infiltración precoz, la baja deportiva estimada es menor en los veteranos. Con una infiltración diferida, es menor en los jóvenes.

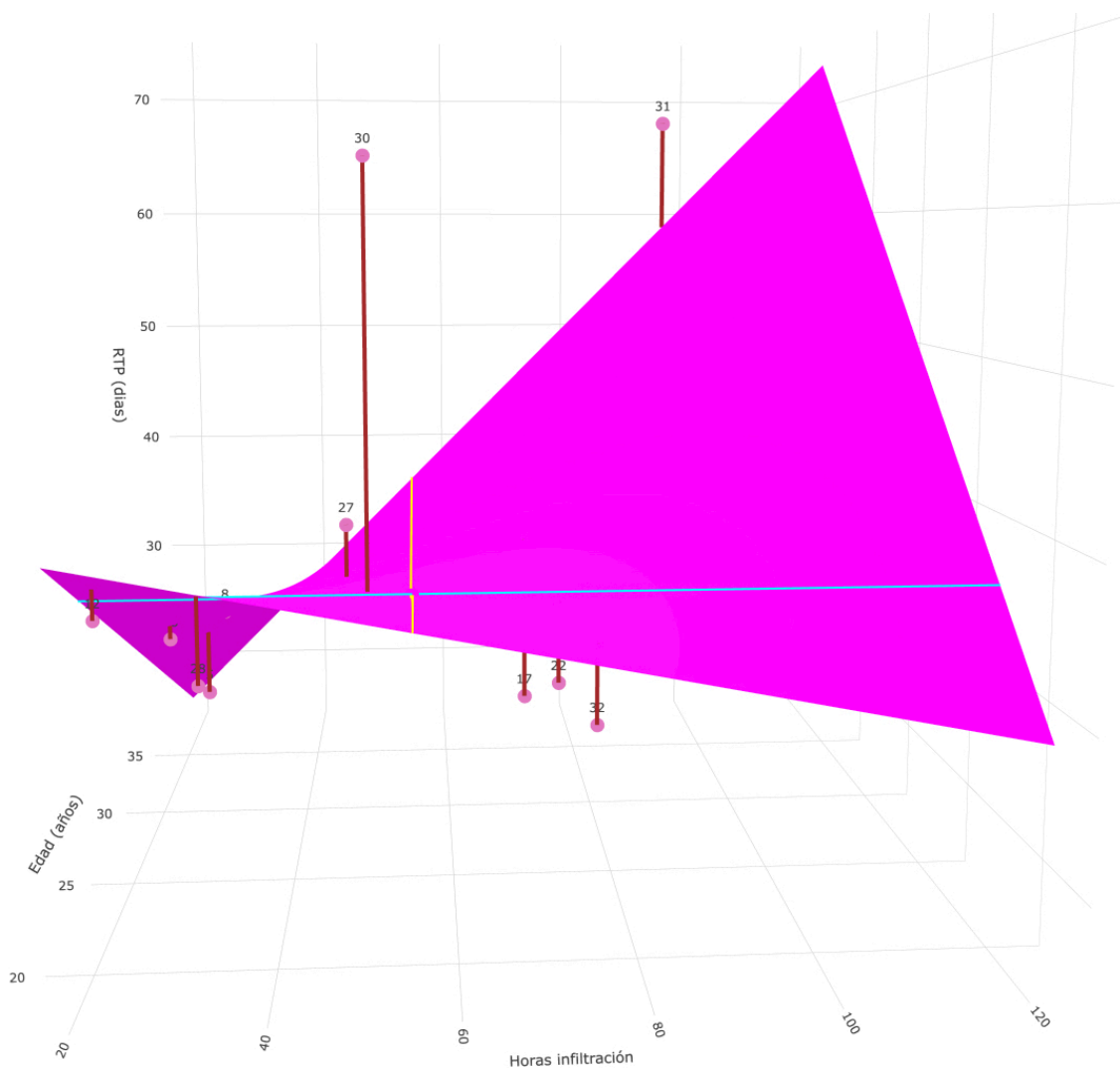


Figura 32 - Punto singular del Momento según el Modelo, empleando Homeopatía en lesiones de la UMT. Con una infiltración precoz, la baja deportiva estimada es menor en los veteranos. En los más jóvenes, la infiltración tiene escasa repercusión.

II. Diferencia entre las bajas deportivas estimadas para cada producto.

Los coeficientes de regresión para cada producto son -0,77 para PRP Puro (IC 95% -1,32-(-0,21), $p=0,0084$) y -0,66 para la homeopatía (IC 95% -1,24-(-0,08), $p=0,0261$). La diferencia entre ambos coeficientes da como resultado el aumento de 0,11 días en la diferencia de la baja deportiva asociado a cada producto por cada hora que se retrasa la infiltración.

Resultado 4:

La diferencia entre las bajas deportivas estimadas para cada producto es mayor cuanto más se retrasa la infiltración, y favorable al uso de PRP Puro. En el modelo obtenido, esta diferencia aumenta en 0,11 días por cada hora transcurrida entre la lesión y el tratamiento.

En consecuencia, con el mismo Momento de infiltración para dos jugadores, la baja deportiva es menor empleando PRP Puro, en comparación con homeopatía.

4.2.7.2 Interacción Edad-Momento.

La interacción entre la Edad y el Momento de infiltración como fuente de variabilidad en la baja deportiva resultó ser significativa, con un coeficiente 0,03, y con p-valor de 0,0041.

Resultado 5:

La Edad modifica el efecto del Momento de la infiltración en la baja deportiva ($p=0,0041$).

Al existir esta interacción, las dos variables Edad y Momento se deben estudiar de forma conjunta. Más adelante se discute si la variable Edad debe estar presente o no de manera independiente en el Modelo de Regresión Lineal Calculado (apartado 4.3).

Para analizar esta interacción, se estimó la baja deportiva con distintas edades y distintos momentos de infiltración.

Puntos singulares de Edad: baja deportiva constante para cualquier Momento.

Para obtener los puntos singulares de Edad con Baja Deportiva constante, se derivan las ecuaciones del Tiempo de Recuperación respecto del Momento de la Infiltración y se iguala a cero (ver anexo 3; apartado 3.2).

Hay un Coeficiente Término-Momento que multiplica a la variable Momento (HrIn). Se trata de un coeficiente que tiene dos formas, dependiendo del tratamiento aplicado:

- **$(-0,77 + 0,03 \times \text{edad}) \times \text{HrIn}$** , para el tratamiento con PRP.
- **$(-0,66 + 0,03 \times \text{edad}) \times \text{HrIn}$** , para el tratamiento con la homeopatía.

Igualando estas ecuaciones a cero y despejando la Edad, se obtiene los puntos singulares de Edad con un mismo Tiempo de Recuperación, independientemente del Momento de la Infiltración: 24,8 para el PRP Puro y 21,4 para la homeopatía. Desde un punto de vista práctico, pueden considerarse los puntos singulares como **25 y 21 años**.

I. Punto singular de Edad y PRP Puro.

- **Jugadores menores de 25 años.** Cuando la edad del jugador es inferior a este punto singular, el coeficiente término-momento se hace negativo y, por tanto, la baja deportiva será menor en la medida que se retrase la infiltración. En consecuencia, con los jugadores más jóvenes tiene sentido esperar a realizar la infiltración con PRP Puro. El momento de infiltración adecuado es a las **72 horas**, que corresponde al margen superior del intervalo en el que fueron realizadas la mayor parte de las infiltraciones.

- **Jugadores mayores de 25 años o “veteranos”.** El Modelo orienta a una baja deportiva menor con la infiltración precoz (coeficiente término-momento menor). El momento óptimo de la infiltración es a las **24 horas**, que representa el límite inferior del intervalo empleado para las infiltraciones.

Por lo tanto, en el Modelo obtenido la Edad del jugador modifica el efecto del Momento de infiltración en la baja deportiva.

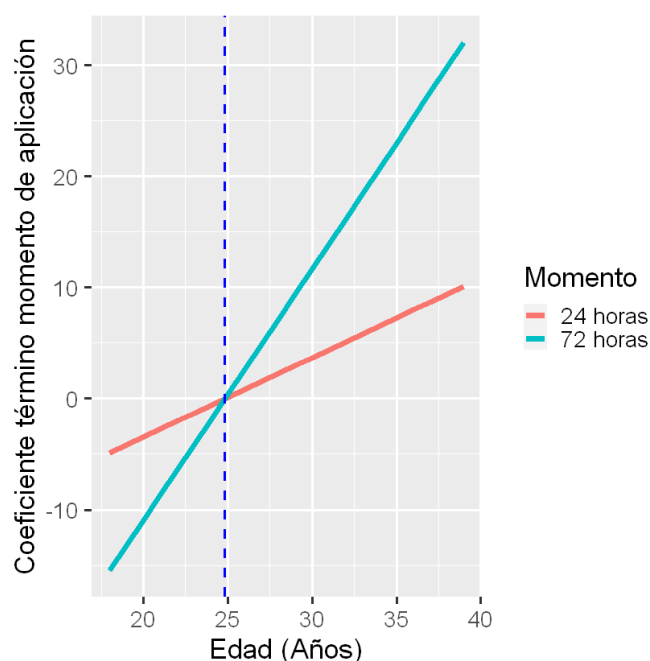


Figura 33 - Coeficiente término-Momento y punto singular de la Edad para el PRP-Puro. Los veteranos se benefician de la infiltración precoz (menor coeficiente). Los más jóvenes se benefician de la infiltración tardía. Hay una importante variación del coeficiente en ambos casos.

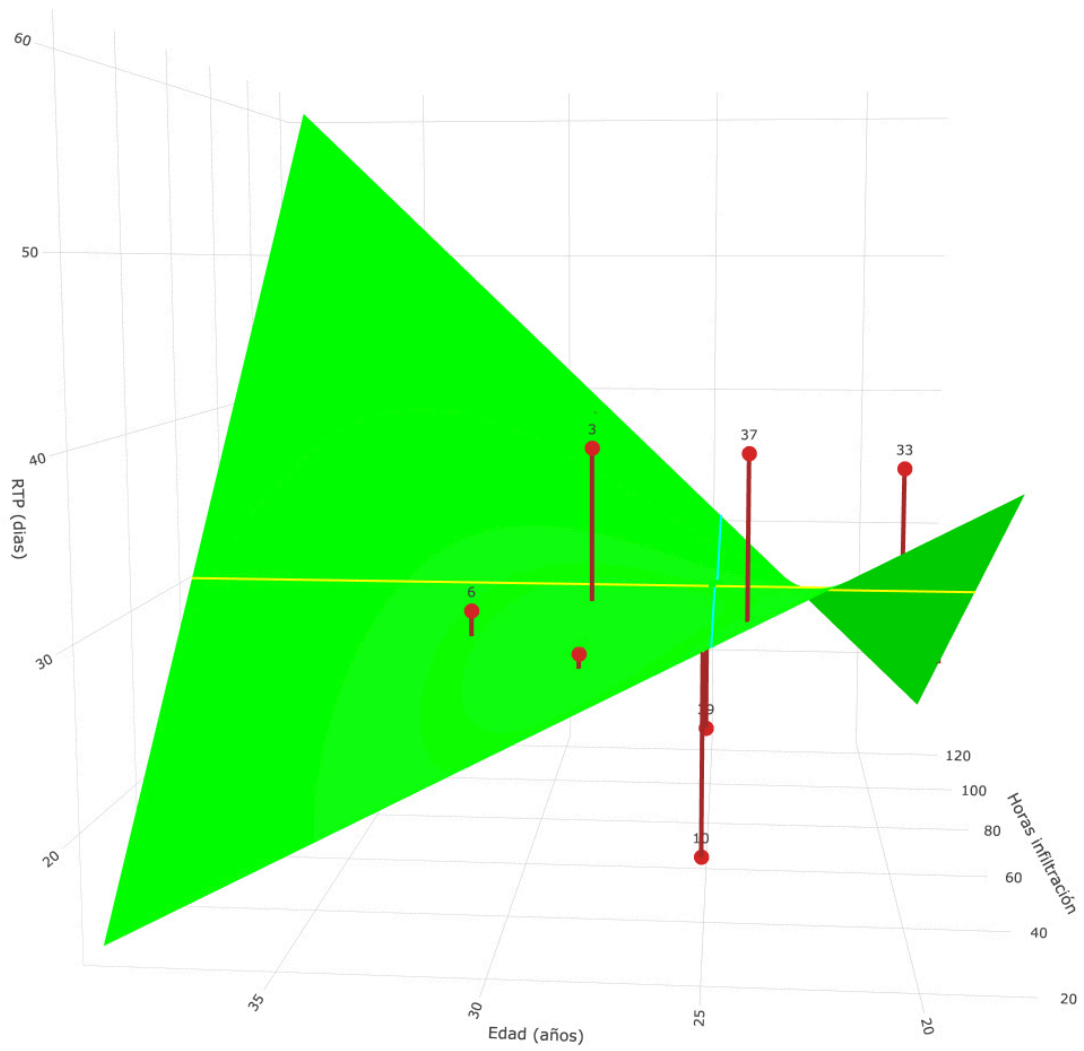


Figura 34 - Punto singular de la Edad según el Modelo, empleando PRP Puro en lesiones de la UMT. A los 25 años (línea azul), la Baja deportiva estimada se mantiene constante, con independencia del Momento de infiltración. Para los mayores de 25 años, la infiltración precoz mejora la baja deportiva estimada. Para los menores de 25 años, la infiltración diferida mejora la baja deportiva estimada.

II. Punto singular de Edad y homeopatía.

El punto singular de Tiempo de Recuperación constante se encuentra en 21 años. Esta edad se encuentra muy cercana al límite inferior de edad considerado en el modelo (18 años). Alrededor de los 21 años, el efecto de la homeopatía sobre el RTP es escaso o nulo, y está representado por una escasa variación en el coeficiente termino-Momento.

En los jugadores más **veteranos**, hay importantes diferencias en el coeficiente termino-Momento entre la infiltración precoz y la tardía. Los datos sugieren que puede existir beneficio con la infiltración precoz, alrededor de las 24 horas.

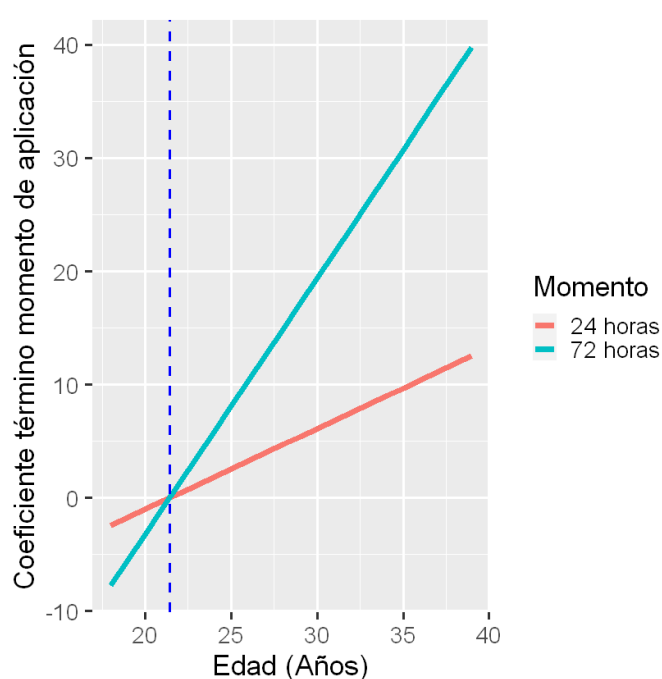


Figura 35 - Coeficiente término-Momento y punto singular de la Edad para la Homeopatía. Los veteranos podrían beneficiarse de la infiltración precoz (menor coeficiente). En los más jóvenes no se aprecian diferencias importantes entre la infiltración precoz o tardía (escasa variación del coeficiente).

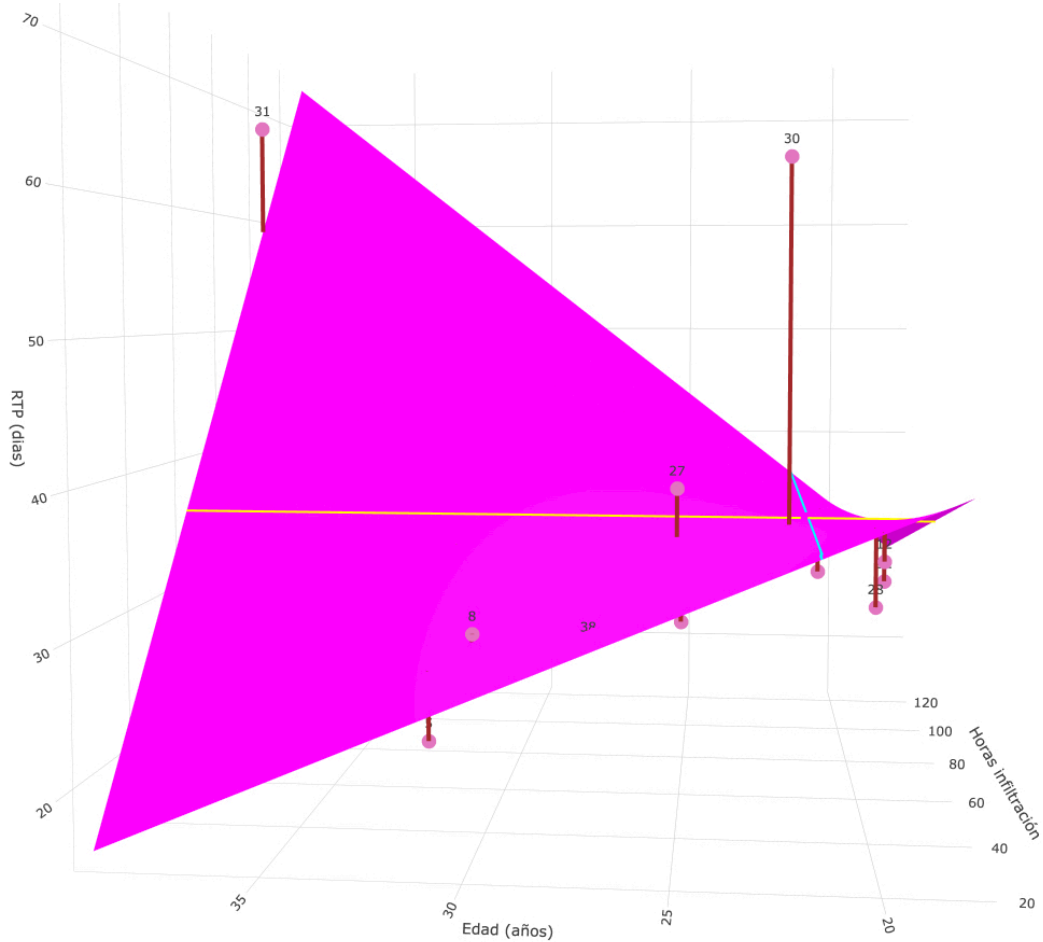


Figura 36 - Punto singular de la Edad según el Modelo, empleando Homeopatía en lesiones de la UMT. A los 21 años (línea azul), la Baja deportiva estimada se mantiene constante con independencia del Momento de la infiltración. Para los más veteranos, la infiltración precoz mejora la baja deportiva estimada. Para los más jóvenes, no se aprecian beneficios con la homeopatía.

En resumen: en base al resultado 3 (el efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración) y al resultado 5 (la Edad modifica el efecto del Momento de la infiltración en la baja deportiva), es posible concluir que:

El efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración y de la Edad. Para disminuir la baja deportiva, es necesario considerar las tres variables (Producto, Momento y Edad) de forma conjunta.

Por lo tanto, considerando Producto, Momento y Edad:

La infiltración de PRP Puro puede disminuir la baja deportiva, eligiendo el Momento de infiltración en función de la Edad.

- A las 24 horas, para mayores de 25 años.
- A las 72 horas, para menores de 25 años.
- El Momento tiene escasa repercusión para jugadores de 25 años: la baja deportiva estimada es constante. Tiene gran repercusión en los jugadores más veteranos y en los más jóvenes.

A continuación, se presentan dos ejemplos, a modo de tablas, para observar la relación entre **Producto, Edad, Momento de Infiltración** y la baja deportiva. Dada la mayor sensibilidad a los cambios del Momento en valores de Edad más extremos (veteranos o muy jóvenes), se ponen los ejemplos con un jugador de 20 años y otro con 30 años.

Jugador joven.

Se propone una edad de 20 años y una lesión de tipo miofascial. Se evalúan dos momentos diferentes, a las 24 y a las 72 horas (diferencia entre ambos de 48 horas).

La diferencia entre los efectos del PRP Puro y la Homeopatía aumenta 0,11 días por cada hora. Representa la diferencia entre los coeficientes de regresión β_3 y $\beta_4 = -0,66 - (-0,77) = 0,11$ (tabla 15). Por lo tanto, teniendo en cuenta las 48 horas transcurridas, la diferencia entre el efecto de cada producto aumenta $0,11 \text{ días} \times 48 \text{ horas} = 5,3 \text{ días}$. Por lo tanto, la baja deportiva es 0,11 días más corta cuando se aplica PRP Puro en comparación con homeopatía, por cada hora transcurrida desde la lesión. Esta afirmación se realiza asumiendo la infiltración en un mismo momento para ambos productos.

M1: la Baja Deportiva calculada en jugador de 20 años con una lesión miofascial infiltrado con PRP Puro a las 24 horas es de 26,9 y con Homeopatía es de 29,6. Diferencia entre efectos de cada producto sobre la baja deportiva en M1: 2,6 días. Cálculos con el coeficiente término momento = $29,6 - 26,9 = 2,6 \text{ días}$.

M2: La Baja Deportiva calculada en un jugador de 20 años con una lesión miofascial infiltrado con PRP Puro a las 72 horas es de 18,8 días y con Homeopatía es de 26,7. Diferencia entre efectos de cada producto sobre la baja deportiva en M2:

Cálculos con el coeficiente término momento = $26,7 - 18,8 = 7,9 \text{ días}$.

Cálculo con la diferencia entre los coeficientes de regresión ($0,11 \text{ días} \times \text{hora de retraso}$)= diferencia de efectos en M1 (2,64 días) + aumento de la diferencia por cada hora transcurrida ($0,11 \text{ días} \times 48 \text{ horas}$) = $2,6 \text{ días} + 5,3 \text{ días} = 7,9 \text{ días}$

Tabla 17 - Baja deportiva en un Jugador de 20 años con lesión Miofascial.
Variación en función del Producto empleado y del Momento de la infiltración (M1=24 horas; M2=72 horas).

PRODUCTO	MOMENTOS M ₁ : 24h; M ₂ : 72 h	Coef.Término Mom(*) x HrInf	Baja deportiva	DIFER. de RTP entre productos
PRP Puro	M ₁ : 24 h	-4,08	26,9	DIFER ₁ = -2,6
Homeopatía		-1,44	29,6	
PRP Puro	M ₂ : 72 h	-12,24	18,8	DIFER ₂ = -7,9
Homeopatía		-4,32	26,7	

(*) $(-0,77 + 0,03 \times \text{Edad})$, para el tratamiento con PRP Puro; $(-0,66 + 0,03 \times \text{edad})$, para el uso de homeopatía.

Los mejores resultados en pacientes jóvenes se observan con el uso de PRP Puro y de forma tardía (a las 72 horas). En ese momento, se estima una diferencia grande entre el efecto de cada producto (7,9 días).

Jugador “veterano”.

Se propone una edad de 30 años, y también una lesión miofascial. También se evalúan dos momentos diferentes, a las 24 y a las 72 horas.

Tabla 18- Baja deportiva en un Jugador de 30 años con lesión Miofascial.

PRODUCTO	MOMENTOS M ₁ : 24h; M ₂ : 72 h	Coef.Término Mom (*) x HrInf	Baja deportiva	DIFER. de RTP entre productos
PRP Puro	M ₁ : 24 h	0,13 x 24 = 3,12	17,1	DIFER ₁ = -2,6
Homeopatía		0,24 x 24 = 5,76	19,8	
PRP Puro	M ₂ : 72 h	0,013 x 72 = 9,36	23,4	DIFER ₂ = -7,9
Homeopatía		0,24 x 72=17,28	31,3	

(*) $(-0,77 + 0,03 \times \text{Edad})$, para el tratamiento con PRP Puro; $(-0,66 + 0,03 \times \text{Edad})$, para el uso de homeopatía.

Ejemplo 2: La baja deportiva calculada en un jugador de 30 años con una lesión miofascial infiltrado con PRP Puro a las 24 horas es de 17,1 días, y con homeopatía es de 19,8 días.

En resumen:

Para los veteranos:

La menor baja deportiva se observa con el uso de PRP Puro y de forma precoz (a las 24 horas).

En ese momento, existe una diferencia estimada pequeña entre el efecto de cada producto (2,6 días), que aumentará progresivamente (0,11 días por cada hora que se retrase la infiltración).

Para los jóvenes:

La menor baja deportiva se observa con el uso de PRP Puro y de forma diferida (a las 72 horas).

En ese momento existe una diferencia estimada grande entre el efecto de cada producto (7,9 días).

4.2.8 Validación del Modelo

Para poder aplicar el Modelo de Regresión Lineal elegido y realizar cálculos estadísticos han de cumplirse varios supuestos, para evitar una falta de ajuste: normalidad e independencia de los residuos, homocedasticidad (varianza del error constante), ausencia de colinealidad entre variables independientes y valores extremos inferiores a los valores umbral.

A continuación, se expone el conjunto de test estadísticos empleados para comprobar la validez del Modelo.

I. Normalidad e independencia de los residuos

Los residuos del Modelo calculado son las diferencias entre los valores de Tiempo de Recuperación observados y los valores pronosticados a partir de la recta de regresión. Los residuos también pueden entenderse como aquella parte de la variación de la baja deportiva que el Modelo de Regresión no explica. En consecuencia, los residuos proporcionan información sobre la exactitud de los pronósticos de forma que cuanto menores son las diferencias, mejores serán los pronósticos.

Normalidad en la distribución. Una de las formas más habituales de comprobar la distribución de los residuos es el gráfico QQ-Plot, que se puede ver en la Figura 37. Se observa que los residuos están prácticamente sobre la recta de la distribución normal, por consiguiente, es posible afirmar que la distribución de los residuos es prácticamente normal.

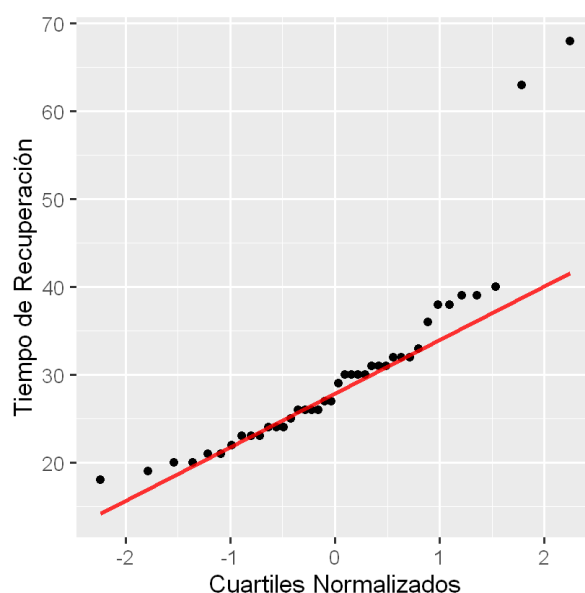


Figura 37 - Distribución de los residuos en un gráfico QQ-Plot.

Otra forma de verlo es mediante el histograma de los residuos. En la Figura 38, se puede observar que los residuos siguen una distribución normal y centrada en cero, con una leve alteración por un valor extremo.

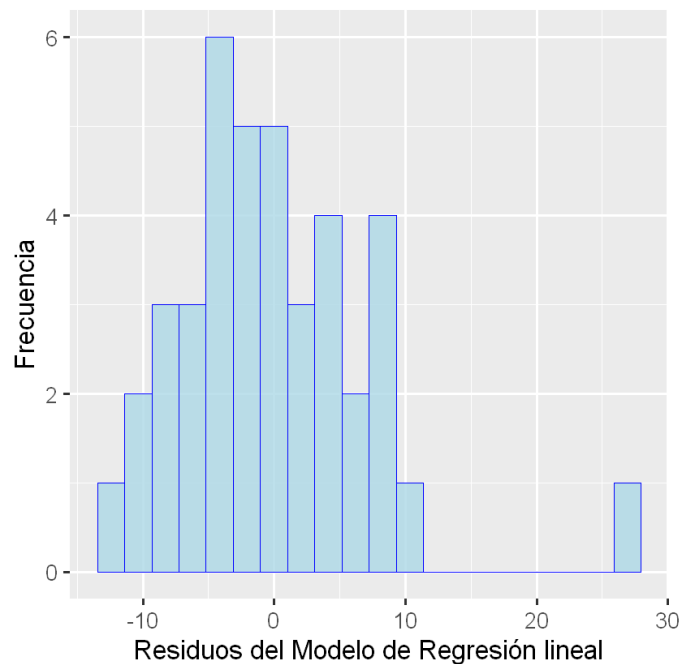


Figura 38 - Distribución de los residuos en un Histograma

Supuesto de independencia de los errores en la regresión lineal (residuos no correlacionados).

Para determinar si los residuos son independientes se empleó el test de Breusch-Godfrey (función “bptest”), disponible en el paquete “lmtest” de R (262). La dependencia secuencial o auto-correlación supondría que las observaciones de la variable dependiente no son extraídas independientemente, generalmente por cercanía en el espacio o en el tiempo.

El contraste de hipótesis se plantea como en ocasiones previas, suponiendo en la hipótesis nula (H_0) que el fenómeno que se busca no existe en realidad (igualdad), y la hipótesis alternativa supone su hallazgo (diferencias):

- H_0 : No existe autocorrelación serial entre los residuos (hay independencia para los errores).
- H_A : Existe auto correlación serial entre los residuos (no hay independencia para los errores).

El resultado de la prueba arroja un p-valor = 0.5118. Como este p-valor es \ggg 0.05, no podemos rechazar la hipótesis nula, por tanto, concluimos que no existe auto-correlación serial entre residuos.

II. Homocedasticidad

Un Modelo predictivo presenta homocedasticidad cuando la varianza del error asociado a las variables independientes es constante a lo largo de las observaciones.

La heterocedasticidad o falta de homocedasticidad se produce cuando existe correlación entre los residuos del modelo y alguna de las variables independientes. Puede ocurrir por variables independientes que poseen un gran recorrido con respecto a su media, o por otros motivos, como la omisión de algunas variables relevantes dentro del Modelo.

Para valorar la homocedasticidad se empleó el test o contraste de White disponible con el método Breusch-Pagan (263), con la función “bptest” de la librería “lmtest” de R . El contraste de hipótesis se planteó de la siguiente forma:

- H_0 : No hay heterocedasticidad en la varianza del error de las variables independientes; modelo homocedástico (los errores tienen varianza constante; hay igualdad).
- H_A : Si hay heterocedasticidad en la varianza del error; modelo no homocedástico (los errores no tienen varianza contante; hay diferencias).

El resultado de la prueba arroja un p-valor = 0. 579. Como este p-valor es $\ggg 0.05$, no es posible rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, se concluye que la varianza es homogénea (hay igualdad de varianza entre errores) y no existen problemas de heterocedasticidad.

III. Ausencia de colinealidad

En un modelo de regresión lineal múltiple existe colinealidad (o multicolinealidad), cuando una variable independiente es una combinación lineal de otra variable independiente. En el caso de existir este efecto habría que excluir alguna de ellas, ya que ambas estarían aportando la misma información al modelo.

En este caso, tenemos dos variables independientes cuantitativas sobre las que tenemos que comprobar este hecho, la variable Momento de la Infiltración y la variable Edad. Se realizó la prueba mediante el método “VIF” de la librería “CAR”, que nos permite calcular el factor de inflación de la varianza (VIF). El resultado es 1.08 para la variable Momento, y 2.65 para la variable edad. Valores por debajo de 10 no suponen problemas de colinealidad en el modelo.

IV. Puntos extremos menores al valor umbral.

Durante el análisis estadístico descriptivo se observó, mediante el diagrama de cajas, que podrían existir algunos puntos extremos (apartado 4.1.3; comprobación visual). Si los puntos extremos exceden de un cierto umbral, puede existir una falta de ajuste en el modelo de regresión lineal.

En primer lugar, se verificó que realmente existía algún punto extremo. Para ello, se utilizó el cálculo de la distancia de Cook para todos los puntos del modelo, mediante el método “influence Plot” de la librería “CAR”. Se calculó esa distancia para los puntos más extremos del Modelo, obteniéndose unos valores de 0,86 y 0,22. Cuando la distancia de Cook es menor de 1, los valores extremos no representan un problema de ajuste para el modelo. Por lo tanto, no fue eliminada ninguna muestra del estudio.

4.3 POTENCIA ESTADÍSTICA Y CAPACIDAD PREDICTIVA DEL MODELO

I. La potencia estadística

La potencia estadística de una prueba o cálculo es su capacidad para **detectar diferencias** entre el grupo de estudio y el grupo control cuando dichas diferencias están presentes (264). En términos estadísticos, también se puede definir como la probabilidad de rechazar la hipótesis nula (igualdad entre grupos) cuando es realmente falsa. Y de otro modo, la potencia estadística también se puede entender como el grado de validez que tienen los hallazgos de la investigación (265).

Cálculo de la potencia estadística.

El cálculo de la potencia estadística del Modelo se basa en tres magnitudes: el tamaño de la muestra, el nivel de error admitido en el experimento y el tamaño de efecto (f^2).

1. **El tamaño de la muestra y el nivel de error admitido.** Se calculó la potencia estadística teniendo en cuenta que la muestra bajo estudio estaba compuesta por 40 jugadores.
2. **El nivel del error α** se fijó en 0.05, por ser el usado habitualmente en Medicina.
3. **El tamaño del efecto** debe entenderse como un indicador que mide la magnitud de las diferencias. Explica el efecto del conjunto de las variables explicativas sobre el Tiempo de Recuperación. Según Cohen J. (265), para el caso de la regresión lineal múltiple, se calcula mediante la siguiente expresión: $f^2 = R^2 / (1-R^2)$.

Los valores de referencia para el tamaño del efecto propuestos recientemente por Rendón-Macías y colaboradores (266) para investigaciones en el ámbito médico son:

- Efecto inexistente: 0-19
- Efecto pequeño: 0.2-0.49
- Efecto moderado: 0.5-0.79
- Efecto grande: 0.8-1.29
- Efecto muy grande: >1.3

A partir del coeficiente de determinación del modelo, $R^2 = 0,486$, y de acuerdo con la expresión enunciada, el tamaño del efecto es $f^2 = 0,946$. Según los umbrales expuestos anteriormente, el efecto resultante del conjunto de las variables es grande (rango 0.8-1.29). Indica una diferencia importante en el Tiempo de Recuperación entre los dos grupos, por lo que se considera que el tamaño muestral y el error admitido fueron adecuados.

El cálculo de la potencia se llevó a cabo mediante el programa G*Power (versión 3.1.9.7). A continuación, se muestra una imagen con el resultado obtenido.

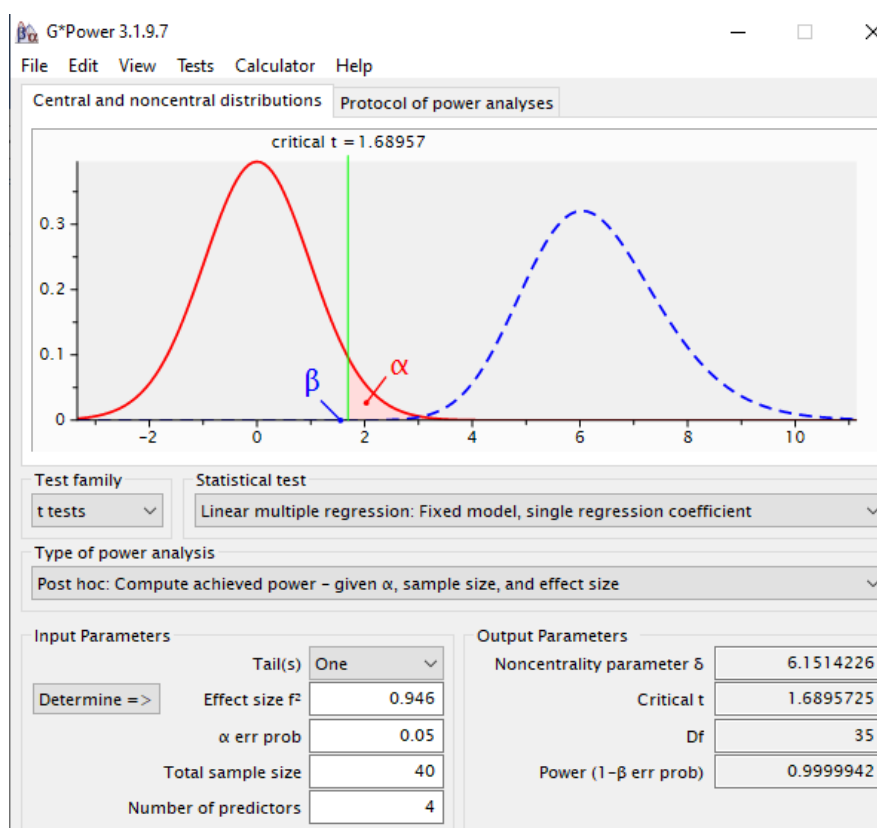


Figura 39 - Cálculo de la potencia estadística del Modelo

Del resultado de la prueba se deduce que a partir del número de jugadores (40), la significación estadística mínima establecida ($\alpha=0.05$), y el tamaño del efecto calculado como grande ($f^2=0.946$), la **potencia estadística del modelo** es de **0.999** (superior a 0.8, el mínimo admitido por convención para considerar los resultados como relevantes) (267).

La potencia alta indica que la muestra de deportistas (40) es representativa de la población de futbolistas federados, y permite inferencia estadística.

II. Capacidad predictiva del Modelo de Regresión

El estadístico F del Modelo obtuvo un p-valor de 0,0003, por lo que se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa: **hay diferencias** en los días de Baja Deportiva al considerar el conjunto de los factores del Modelo. Es posible afirmar que el modelo explica globalmente el Tiempo de Recuperación y, en consecuencia, se deduce que el modelo tiene **capacidad predictiva**.

Para evaluar la capacidad predictiva se calcularon los Tiempos de Recuperación según el Modelo y se obtuvo el error cuadrático medio y el error absoluto medio. También se elaboró un gráfico

donde se puede observar las diferencias entre los puntos reales (línea negra), junto a los puntos calculados por el modelo (línea roja) (Figura 40).

Predicción del Tiempo de Recuperación

Los términos de error obtenidos son:

- Error cuadrático medio: 7,2 días
- Error absoluto medio: **5,42 días**

Resultado 6:

El Modelo obtenido tiene capacidad predictiva para la baja deportiva. Conociendo el Tipo de Lesión y la Edad del jugador, y aplicando PRP Puro en un Momento concreto, es posible estimar el Tiempo de Recuperación con un error absoluto medio de 5,4 días.

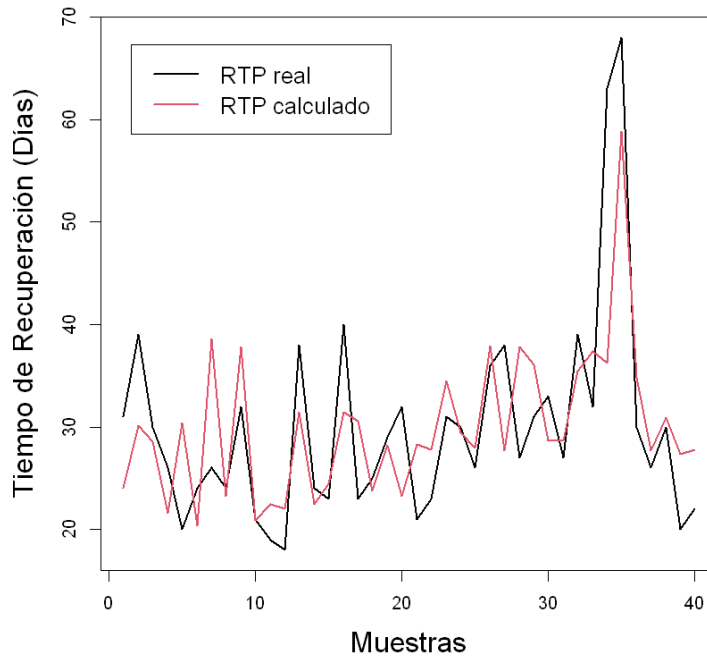


Figura 40 - Baja deportiva real frente a la baja deportiva calculada con el Modelo.

En resumen: el Modelo obtenido permite estimar la baja deportiva considerando las fuentes de variabilidad Tipo de Lesión, Edad, Producto-Momento y Edad-Momento.

Dado un caso de un jugador/a con una edad concreta y un tipo de lesión determinada (factores no modificables), aplicando un Producto concreto en un determinado Momento, es posible estimar la baja deportiva, con un error absoluto medio de 5,42 días.

4.4 IMPORTANCIA DE CADA FACTOR DEL MODELO EN EL TIEMPO DE RECUPERACIÓN

En este apartado se evalúa el **tamaño del efecto de cada variable independiente** en el Modelo de Regresión Lineal Múltiple. En este caso, el tamaño del efecto de cada variable (f^2) se determina eliminando dicha variable del modelo y recalculando el coeficiente de determinación R^2 .

La expresión que permite este cálculo es: $f^2 = \frac{R_{incluida}^2 - R_{excluida}^2}{1 - R_{incluida}^2}$

El resultado del análisis se muestra en la Tabla 19. La evaluación del tamaño del efecto se lleva a cabo según los umbrales ya comentados y propuestos por Rendón-Macías y colaboradores (266). Se observa que el mayor tamaño del efecto se produce debido a la interacción de las variables Producto Infiltrado (PrInf) y Momento de la Infiltración (HrIn). Dicho efecto, aunque es estrictamente pequeño, está en el umbral de ser un efecto moderado.

La variable Edad fue considerada como variable independiente en el Modelo Teórico de Investigación, y resultó ser una variable relevante en la selección del Modelo. Su coeficiente de regresión fue significativo, con un p-valor de 0,0220. Al existir la **interacción Edad-Momento** y ser significativa, parece lógico pensar que la relevancia de la Edad viene dada cuando se tienen en consideración de forma conjunta ambas variables. En este sentido, puede ser considerado el resultado “efecto inexistente” asociado a la Edad como variable independiente aislada (sin interacción). El p-valor indica una probabilidad baja de error al aceptar que hay diferencia en la baja deportiva asociada a la Edad y que sea falso (H_1). Y el tamaño del efecto indica la ausencia de relevancia de la Edad de manera aislada en la Baja Deportiva dentro del Modelo de Regresión Lineal. Estos datos orientan a la consideración conjunta de la Edad y el Momento de la Infiltración.

La interacción **Producto-Momento** puede ser considerada como la principal responsable del Tiempo de Recuperación en el Modelo, ya que presenta el mayor tamaño del efecto. Además, es la única fuente de variabilidad en la baja deportiva que es modificable. Tanto el producto infiltrado como el momento para hacerlo, dependen totalmente de la decisión del médico, lo que implica una importante capacidad de intervención sobre la baja deportiva.

Tabla 19 - Tamaño del efecto de las variables sobre la baja deportiva

Evaluación del tamaño del efecto: inexistente 0-19, pequeño 0,2-0,49, moderado 0,5-0,79; grande 0.8-1.29; muy grande: >1.3. PrInf: Producto Infiltrado. HrIn: Horas hasta la infiltración. Referencia: Rendón 2021.

	Tipo de lesión (Ls)		Edad		Interacción PrInf:HrIn		Interacción Edad:HrIn	
	Incluida	Excluida	Incluida	Excluida	Incluida	Excluida	Incluida	Excluida
R²	0.486	0.345	0.486	0.400	0.486	0.257	0.486	0.343
F²	0.265		0.160		0.435		0.268	
Tamaño del efecto	Pequeño		Inexistente		Pequeño+		Pequeño	

4.5 RESUMEN DE LOS RESULTADOS

En primer lugar, fue planteado un marco teórico de investigación donde se consideraron las distintas variables para formar parte del estudio y las interacciones del Momento con el Producto y con la Edad.

A partir del análisis de los datos, se calcularon varios Modelos predictivos de Regresión Lineal, y se eligió el que presentó mejor ajuste para explicar los días de baja deportiva. Se compone de 4 fuentes de variabilidad: dos variables (Tipo de Lesión y Edad) y dos interacciones (Producto-Momento y Edad-Momento).

El cálculo del Modelo de Regresión Lineal predictivo del Tiempo de Recuperación se realizó en “R”, obteniéndose los parámetros característicos del modelo: estadístico F, coeficiente intercepto, coeficientes de regresión, p-valor asociado e intervalos de confianza (Tabla 16).

El p-valor del Modelo asociado al estadístico F fue 0,0003, por lo que se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la alternativa: hay diferencias en los días de baja deportiva al considerar el conjunto de los factores incluidos en el Modelo. Las fuentes de variabilidad analizadas en este estudio (tipo de Lesión, Edad y las interacciones Producto-Momento y Edad-Momento) explican el 49% de la variabilidad en la baja deportiva ($R^2 = 0,49$).

Se observó que el efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del **Momento de la infiltración**. Además, la diferencia entre las bajas deportivas estimadas para cada producto es mayor cuanto más se retrasa la infiltración, y favorable al uso de PRP Puro. Esta diferencia aumenta en 0,11 días por cada hora transcurrida entre la lesión y el tratamiento.

A partir de las ecuaciones del Modelo y teniendo en cuenta las interacciones que se producen (anexo 3, apartado 3.3), es posible obtener un conjunto de puntos singulares o característicos del Modelo que ayudan a comprender el efecto del Producto y de la Edad sobre el Tiempo de

Recuperación. Los cambios en el Momento de Infiltración tienen mayor repercusión en los jugadores más veteranos y en los más jóvenes, mientras que con una Edad alrededor de los 25 años tienen escasa repercusión. Con el uso de PRP Puro, se estimó que con los pacientes mayores de 25 años tienen una menor baja deportiva con la infiltración precoz, a las 24 horas. Y los menores de 25 años, con la infiltración diferida, a las 72 horas.

Fueron comprobados los supuestos que han de cumplirse para poder emplear el Modelo de Regresión Lineal. Y fue posible concluir que el Modelo de Regresión Lineal obtenido cumple con las condiciones necesarias para poder llevar a cabo el proceso de inferencia estadística a través de los parámetros del mismo.

Por último, fue calculado el tamaño del efecto del conjunto de las variables independientes sobre la Baja Deportiva, que fue grande ($f^2=0.946$), comprobándose que el tamaño muestral y el error admitido fueron adecuados. Con estos tres elementos se calculó la potencia estadística del modelo, que es alta (0.999). El Modelo calculado tiene capacidad de detectar diferencias entre grupos, lo que supone un alto grado de validez de los hallazgos (rechazo de la hipótesis nula cuando es falsa).

El Modelo obtenido tiene capacidad predictiva para la baja deportiva. Conociendo el Tipo de Lesión y la Edad del jugador, y aplicando PRP Puro en un Momento concreto, es posible estimar el Tiempo de Recuperación con un error absoluto medio de 5,4 días.

El contraste de hipótesis se realizó en base al nivel de significación elegido ($\alpha =0.05$) y a la significación obtenida (p-valor) en el cálculo de los coeficientes de regresión de cada factor del Modelo de Regresión. La valoración de las hipótesis planteadas y el tamaño del efecto de cada variable puede verse en la Tabla 20.

Tabla 20 - Resumen de la valoración de las hipótesis.

Hipótesis	Descripción	Coficiente	p-valor	Valoración	Tamaño del efecto
H1	El Tipo de Lesión influye en el Tiempo de Recuperación.	7,88	0.0043	Aceptada	0,265
H2	El Producto Infiltrado influye en el Tiempo de Recuperación (sin considerar interacciones)		ns	Rechazada	
H3	El Momento de la infiltración influye en el Tiempo de Recuperación (sin considerar interacciones)		ns	Rechazada	
H4	La Edad del paciente influye en el Tiempo de Recuperación.	-1,70	0.0220	Aceptada	0,160
H5 ₁	La interacción homeopatía - Momento influye en el Tiempo de Recuperación	-0,66	0.0261	Aceptada	0,435
H5 ₂	La interacción entre el tratamiento con PRP Puro y el Momento de la infiltración influye en el Tiempo de Recuperación	-0,77	0.0084	Aceptada	0,435
H6	La interacción entre la Edad del paciente y el Momento de la infiltración influye en el Tiempo de Recuperación.	0,03	0.0041	Aceptada	0,268

5 DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

A lo largo del presente trabajo de investigación se ha intentado dilucidar el efecto que tiene el PRP Puro en las lesiones musculares, en relación con los días empleados en la recuperación funcional del jugador. En base a este objetivo, se discuten a continuación los resultados obtenidos en relación con otras publicaciones, y también la estimación de la baja deportiva en función de los factores analizados. Finalmente, se realiza una propuesta de protocolo de uso del PRP Puro en las lesiones musculares agudas, con especial incidencia en el registro de datos y en la evaluación de los resultados.

5.1 COMPARATIVA CON OTRAS PUBLICACIONES

Se observan discrepancias en los resultados del uso de PRP en el tratamiento del tejido muscular lesionado, tanto a nivel de ciencia básica en los estudios de laboratorio (174), como en personas (144), (155). Los ensayos controlados aleatorizados aún son muy escasos. No se encuentran diferencias significativas entre grupos en el tiempo de recuperación en 3 estudios, de los autores Reurink, Hamilton, Martínez-Zapata (179, 214, 215), y si existen en los otros 4 de Hamid, Rossi, Bubnov y Bezuglov (213, 216, 217, 268).

Hay que tener en cuenta que en todos estos trabajos, se realiza una asociación entre la aplicación del producto y una posible recuperación funcional temprana del jugador (menor baja deportiva), como indicador del proceso de regeneración muscular. Pero para comprender y discutir los resultados, hay tener en cuenta que existen **múltiples variables** que pueden influir en la baja deportiva, asociadas al jugador/a, al tratamiento, a la evolución de la recuperación y a la vuelta al juego sin restricción (Tabla 21). A continuación, se discute la relevancia de varias de estas variables.

Tabla 21 - Principales variables que modifican el Tiempo de Recuperación.

JUGADOR	TRATAMIENTO	EVOLUCIÓN	VUELTA AL JUEGO
Tipo de lesión	Tipo de Producto	Rehabilitación	Criterios de Alta
Edad	Momento (horas)		

Discusión sobre la caracterización del PRP y la Baja Deportiva.

Es fundamental en investigación y en la práctica clínica la **descripción completa del PRP**, desde el punto de vista de su obtención, composición y aplicación (132). En un interesante artículo de Chahla, en el 2017 (269), se indica que solo en 11 de 105 estudios (10%) se daban informes completos del protocolo de preparación del PRP, y solo en 17 de 105 (16%) proporcionan valores cuantitativos de la composición del producto final. Esto debe cambiar. La descripción completa del PRP empleado supone un primer paso esencial para poder comparar los efectos asociados a diferentes PRPs.

En el presente trabajo, se obtuvo **PRP Puro** mediante un sistema de centrifugación única que permite una buena separación de los distintos tipos de células sanguíneas por densidades. Se registró el volumen de sangre total empleado, la proporción adecuada de anticoagulante para evitar diluir las muestras, y el volumen total de PRP obtenido, que posteriormente fue infiltrado en su totalidad.

En relación con la **composición del PRP**, es importante destacar que en 3 de los 7 estudios aleatorizados publicados sobre el tratamiento de las lesiones musculares no se detalla la composición del PRP (213, 216, 217). Esto proporciona una idea de hasta qué punto nos encontramos en la fase inicial del desarrollo de la investigación en esta área. En la revisión sistemática de Kunze y colaboradores (174), se indica que las distintas formulaciones del PRP pueden tener distintos efectos en la proliferación y la diferenciación de los mioblastos, y que favorecer ambos procesos puede ser la causa de la regeneración muscular acelerada y la reducción de la fibrosis observada en distintos estudios in vivo (81), (119), (211), (270).

La concentración plaquetaria obtenida en el PRP suele ser entre 2 y 5 veces más elevada que la concentración en sangre periférica, dependiendo de los sistemas de obtención empleados. No parece ser un factor fundamental en la regeneración tisular. Entre los estudios que no encontraron diferencias con el uso de PRP, Reurink y colaboradores emplearon una concentración de 400-500 x10³ plaquetas/μL, cifra similar a la empleada en el estudio presentado en esta tesis. Hamilton empleó casi el doble, y Martínez-Zapata el triple. Entre los estudios que obtienen resultados positivos con el uso de PRP, solo Hamid reportó la composición celular. Utilizó una elevada concentración plaquetaria (1297 x10³/μL) en un plasma leuco enriquecido (38,3 x10³/μL). Además, la ausencia de un grupo control recibiendo una infiltración representa una importante limitación en este grupo de estudios.

La ausencia de **hematíes**, o su presencia mínima, es lo habitual (<1x10⁶/μL) (132), ya que no se describen efectos sobre la miogénesis y se puede conseguir su separación con facilidad con los distintos sistemas de centrifugación (271).

La presencia de **leucocitos** sí parece ser un factor fundamental en la formulación del PRP. Los leucocitos que forman la línea de separación entre los glóbulos rojos y las plaquetas ("buffy

coat”) son los neutrófilos. Los eosinófilos y los basófilos se suelen romper durante la centrifugación, y los monocitos y macrófagos tienen una densidad similar a las plaquetas. En el estudio presentado en esta tesis existe una presencia mínima leucocitaria ($0,02 \times 10^9/L$), parecida a la de Martínez-Zapata, muy inferior al plasma leuco reducido empleado por Reurink ($1,9 \times 10^9/L$) y muy diferente al Plasma leuco enriquecido empleado por Hamilton ($26,1 \times 10^9/L$).

Las formulaciones de PRP leuco reducidas limitan la presencia de TGF-Beta (posible fibrosis en caso de concentraciones locales muy elevadas) (81) y miostatina (limita el crecimiento muscular), y es posible que mejoren el proceso de curación (119, 120, 174). También limitan la presencia de moléculas catabólicas, como la mieloperoxidasa (119), (272). Pero hay que tener en cuenta que la presencia de leucocitos en la regeneración tisular es necesaria, tanto mieloides (neutrófilos, eosinófilos, y monocitos/macrófagos) (43) como linfoides (principalmente linfocitos T) (273). Los neutrófilos son fundamentales en la limpieza de las miofibras destruidas o que sufren apoptosis (42), y como principal fuente de VEGF tras la lesión (274), (119) y para la atracción de monocitos/macrófagos (41).

La Homeopatía también parece tener un efecto positivo infiltrada precozmente en los jugadores más veteranos, mientras que en los jóvenes no produce cambios relevantes. Los mecanismos pueden ser varios. El propio hecho de diluir los distintos tipos de molécula inflamatorias (proteínas, DAMPS, y otras) en el microentorno de la lesión, puede disminuir el estrés celular y podría modular el proceso reparativo/regenerativo.

En relación con la **aplicación del PRP**, se infiltró la totalidad del PRP obtenido, con excepción de una cantidad mínima de muestra para su análisis. Es importante reseñar en los estudios el **volumen de PRP infiltrado en relación con el volumen obtenido (%)**. Con cierta frecuencia no son coincidentes y no se suele indicar. Esto es debido a que en muchos casos se emplea una parte del PRP, la denominada por algunas casas comerciales como “fracción rica del PRP”, por una mayor concentración de plaquetas. Este planteamiento puede no ser adecuado, principalmente por dos motivos. En primer lugar, los PRPs obtenidos mediante los sistemas que realizan la diferenciación de fases (glóbulos rojos, leucocitos neutrófilos y plasma), presentan en el plasma un gradiente de concentración plaquetaria, que es mayor en la parte cercana a los leucocitos y menor en la alejada. Por lo tanto, la división en fracción pobre y fracción rica no parece adecuada, al tratarse de un gradiente y no de dos productos diferentes. En segundo lugar, en distintos artículos se ha observado que el llamado “Plasma Pobre en Plaquetas” puede tener múltiples acciones positivas, como estimular la diferenciación de células satélite (120), la angiogénesis por la presencia de la proteína Flt-1 (receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGFR1 (119) y por su contenido en exosomas, que contienen factores de crecimiento, mRNA o micro-RNAs (275).

El **volumen de PRP infiltrado** varía mucho entre las distintas publicaciones. Independientemente del resultado, en casi todos los estudios se emplearon volúmenes pequeños (menores o iguales a 5 ml). En los estudios que no encuentran beneficios con el PRP, se emplearon 3 ml en dos ocasiones (Reurink) (179), y 3 ml en una ocasión (Hamilton) (214). Martínez-Zapata empleo un volumen mayor (6 ml) en una única infiltración, pero lo hace en momentos muy alejados del día de la lesión (14 días de media en el grupo de intervención y 21 en el de control) (215). Por otro lado, en los estudios que observaron beneficio se realizó una única infiltración, con un volumen pequeño de 3 ml en un estudio (Hamid) (218), y mayor en el resto: 5 ml (Bubnov)(213), un volumen “proporcional a la lesión” (Rossi) (216), y 8 ml (Bezuglov) (217). La elección en el ensayo clínico planteado en esta tesis fue utilizar volúmenes importantes, alrededor de los 6 ml de PRP, lo que se encuentra en la misma línea de los estudios con resultados positivos. Esta elección fue también adoptada en un estudio observacional retrospectivo muy interesante del año 2018, donde Borrione y colaboradores evalúan pacientes que sufrieron una lesión grado I o II en la unión miotendinosa distal del gastrocnemio medial (276). Se compararon resultados funcionales en 31 pacientes que recibieron un **volumen grande de PRP Puro (10 ml)** frente a 30 pacientes en el grupo control con tratamiento habitual (rehabilitación). Se realizaron 3 infiltraciones: la primera a los $8,2 \pm 7,5$ días, la segunda una semana más tarde, y la tercera otra semana más tarde. A pesar de la variabilidad en el momento de las infiltraciones, los resultados fueron muy favorables al uso de PRP Puro, tanto en los días necesarios para caminar sin dolor (22 vs 52), como en los días necesarios para regresar a la práctica deportiva (53 vs 119).

Una posible clasificación del volumen, en base a las publicaciones previas, podría ser la siguiente:

- **volumen pequeño (menos de 5 ml), intermedio (5-9 ml) y grande (más de 9 ml).**

A pesar de no existir suficientes datos para definir cuál es la mejor opción, en base a los resultados obtenidos, junto con los buenos resultados de Bezuglov (8 ml) (217) y Borrione (10 ml) (276), parece adecuado emplear **volúmenes intermedios o grandes**.

Discusión sobre el tipo de Lesión y la Baja Deportiva.

La agrupación de las lesiones en intramusculares y miofasciales (grupo I), y en lesiones miotendinosas (grupo II), posibilitó cuantificar la diferencia en los días de baja deportiva entre los grupos. En el Modelo de Regresión Lineal obtenido se observó que la baja deportiva es superior en un jugador con una lesión miotendinosa en **$7,9 \pm DS 5,2$ días** (IC 95% 2,6-13,1) frente a la lesión intramuscular o miofascial, en igualdad de Producto, Momento y Edad. Este cálculo fue posible debido a que no existen interacciones significativas entre el tipo de lesión y los otros tres factores (Producto, Edad y Momento). La probabilidad de que el RTP sea igual para los diferentes grupos de lesión es muy baja, del 0,4% ($p= 0,0043$).

Estos resultados están en concordancia con otros estudios relevantes con series de casos muy largas, donde se asocia un pronóstico al tipo de lesión, como el artículo de Eskstrand del 2013 (29), donde se valida la clasificación del consenso de Munich , y el artículo de Pullock del 2016, basado en la clasificación británica (277).

En relación con las recidivas, en el estudio presentado se observaron un número similar en ambos grupos de tratamiento: dos recidivas en lesiones de la UMT y una recidiva en una lesión intramuscular en cada grupo. Teniendo en cuenta que la incidencia de recidivas esta alrededor del 10-20% de los casos (278) , son necesarios grupos mucho mayores de pacientes para comparar los casos de recidivas y evaluar si el tratamiento con PRP Puro mejoró su incidencia. Parece existir un riesgo mayor de recidivas en las lesiones de la UMT, pero los resultados en este sentido, en este y otros estudios citados, no son concluyentes.

En la valoración del riesgo de recidivas, en el trabajo de Vicens-Bordas y colaboradores del 2020 observaron variaciones en la recuperación de la fuerza en función de la severidad de la lesión (279). Observaron que la recuperación funcional no fue total en las lesiones más graves. En un estudio con jugadores de fútbol no profesionales, vieron que aquellos que en la temporada previa presentaron lesiones en isquiotibiales con una duración superior a las tres semanas tuvieron una disminución de la fuerza excéntrica en la pretemporada. Esto se encuentra alineado con otros estudios que indican que las lesiones severas tienen una peor adaptación neuromuscular: peor inhibición de estímulos, atrofia selectiva y cambios en las relaciones del ángulo de torsión de la articulación (280), (281). Esto implica menor fuerza excéntrica de los isquiotibiales y un posible mayor riesgo de presentar recidivas en las lesiones diagnosticadas como severas.

Por último, cabe recordar que la recuperación estructural, en este y otros ensayos aleatorizados, se supone asociada a la capacidad funcional. Pero hay publicaciones que indican que la recuperación funcional puede ser más rápida que la estructural (282). Lo adecuado, para objetivar la nueva estructura del tejido, sería realizar **biopsias musculares** transcurridas varias semanas desde el tratamiento, en un momento próximo al alta médica. Es una medida de compleja aplicación en deportistas, al suponer un nuevo daño en el tejido, pero que sin duda sería de gran valor en el ámbito del deporte y en la población en general, para poder evaluar directamente la regeneración muscular.

5.2 BAJA DEPORTIVA Y MOMENTO DE INFILTRACIÓN

El resultado principal del estudio fue que el efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración. Por lo tanto, modificando el Momento de la infiltración es posible modificar la baja deportiva.

5.2.1 MOMENTO Y PRODUCTO

Al comparar los días para la recuperación estimados con las infiltraciones de PRP Puro frente a los estimados con homeopatía, se observaron mejores resultados con el uso de PRP Puro. El coeficiente del modelo asociado a homeopatía es -0,66, mientras que asociado a PRP Puro es -0,77. Esto significa que la diferencia entre el efecto provocado por los productos en la Baja Deportiva aumenta en 0,11 días por cada hora que se retrasa la infiltración, a favor de la infiltración de PRP Puro. En fases muy tempranas (24-30 horas) la diferencia en el Tiempo de Recuperación entre los productos es pequeña, y posteriormente es mayor.

El microambiente en el tejido muscular lesionado cambia con rapidez. Por lo tanto, las necesidades y acciones de las células varían en cada etapa de la curación (168), **modificándose su capacidad de acción frente a determinados estímulos en una secuencia temporal**. En base a los resultados obtenidos, el PRP podría mejorar las acciones de distintos fenotipos celulares y mejorar así la regeneración tisular.

Existe un **periodo temporal óptimo y limitado** para la acción de estímulos exógenos, como la infiltración de PRP (164). En este sentido, cabe destacar el trabajo de Yang y colaboradores, del año 2022, (184) en relación con la regeneración del cartílago en lesiones osteocondrales provocadas en ratones. Observaron que los macrófagos promueven la regeneración del cartílago **en función de su fenotipo y en un modo tiempo-dependiente**. Infiltraron distintos tipos de macrófagos en lesiones osteocondrales, y observaron la contribución de los macrófagos M2c a la regeneración osteocondral, por dos principales vías: por un lado, las citoquinas y los factores de crecimiento liberados, como IL-10 y TGF- β , pueden realizar funciones de protección y regulación del proceso de ostogénesis y condrogénesis. Por otro lado, también lo asociaron al Momento de su infiltración. Con la infiltración de estos macrófagos tanto en el día 0 (cuando se provoca la lesión) como en el día 14, se observó regeneración del hueso subcondral, mientras que con la infiltración a los 14 días también se apreció regeneración del cartílago. Este tiempo de dos semanas se consideró necesario para el reclutamiento masivo de las células madre, lo que representa un hallazgo similar al de otros autores (1-2 semanas) (283, 284). En la misma línea, en otros artículos también se destaca el **Momento de exposición al contenido plaquetario** en el tejido lesionado como un factor fundamental en la regeneración tisular: Terada 2013 (230), Dimauro 2014 (45), Padilla 2015 (231), Aguilar 2015 y 2018 (232, 233), Cezar 2017 (234). Por lo tanto, debería registrarse ese momento inicial con exactitud, en **horas**, para definir

progresivamente cuando se obtienen los mejores resultados de recuperación funcional y estructural del tejido.

En base a los resultados obtenidos, las bases biológicas de la regeneración muscular y las publicaciones previas sobre el uso de PRP en el músculo, se discute a continuación el uso del PRP Puro en la lesión muscular aguda en el periodo entre las 24 y las 72 horas, y posteriormente.

Evitar la infiltración en un microambiente de necrosis e inflamación: primeras 12-24 horas

Perdiguero y colaboradores, en el año 2011 (285), observaron en un modelo animal y en otro ex vivo, que concentraciones suprafisiológicas de IL-10 en la fase pro-inflamatoria de la reparación muscular producía un empeoramiento de la regeneración (disminución del área transversa de las miofibras observadas a los 7 días). En el laboratorio, con la estimulación simultánea de TNF (necrosis e inflamación) y de IL-10 (miogénesis), tampoco se observó un efecto proliferativo y se redujo el número de células satélite por fibra.

Saclier y colaboradores, en el 2013 (52), tanto en modelo in vitro como in vivo, observaron que concentraciones altas de VEGF, junto con una elevada presencia de M1, promueven la proliferación e inhiben la diferenciación celular (disminución de miotubos), empeorando la miogénesis.

Y Wang y colaboradores, en el año 2014 (286), observan en ratones que la ablación de monocitos/macrófagos CD11b⁺ (proinflamatorios) en el primer día tras la lesión muscular provoca un empeoramiento en la regeneración (miofibras más pequeñas, aumento de los residuos necróticos y acumulación grasa), mientras que la ablación en el día 4 no altera el proceso. En la misma línea, en un interesante artículo de Borrione y colaboradores del año 2014 (42), se infiltró PRP Puro de manera inmediata en las lesiones musculares provocadas en ratas, y se estudió la respuesta inflamatoria temprana, en cada uno de los primeros 6 días. Se observó un aumento de los macrófagos y de los linfocitos citotóxicos, y disminución de los LT colaboradores. Esto es negativo para la miogénesis, si tenemos en cuenta que en condiciones normales se ha descrito un importante aumento de los LT colaboradores inicialmente (51, 273), con secreción importante de citocinas, y posterior aumento asociado de linfocitos T reguladores, fundamentales en el proceso regenerativo muscular.

Estos resultados se encuentran alineados con las observaciones de la investigación citada de Yang y colaboradores (184), quienes infiltraron macrófagos M2c a nivel articular el mismo día de producir una lesión osteocondral en ratones, y también a los 14 días. Pasados unos días, encontraron un descenso importante de los M2c en la membrana sinovial y en la lesión osteocondral, cuando la infiltración se realizó el día 0, probablemente por el ambiente pro-inflamatorio inicial, mientras que la infiltración en el día 14 tuvo un descenso menor.

Otro motivo para evitar las infiltraciones muy precoces son las concentraciones altas de mieloperoxidasa, que actúan en la fase precoz tras la lesión muscular para destruir el tejido dañado, y es secretadas por los leucocito (119).

En base a estas publicaciones, y a los resultados positivos obtenidos en el estudio presentado, se debe considerar evitar la infiltración de PRP Puro muy precoz, cuando la concentración de moléculas pro-inflamatorias es más elevada (primeras 12-24 horas) (287).

Tabla 22 - Bases para evitar la infiltración muy precoz de PRP tras la lesión muscular aguda. Necrosis de miofibras y microambiente inflamatorio.

SISTEMA INMUNE-MIOGÉNESIS	REFERENCIAS
1. La infiltración de PRP Puro de manera inmediata provocó aumento de macrófagos y de LT CD8+ (citotóxicos), y disminución de LT CD4+ (colaboradores).	Borrione, 2014: "Experimental model for the study of the effects of PRP on the early phases of muscle healing".
2. La ablación de monocitos/macrófagos proinflamatorios en el 1er día provocó miofibras más pequeñas, aumento de los residuos necróticos y acumulación grasa, que no ocurrió al realizarla el día 4.	Wang, 2014: "Altered Macrophage Phenotype Transition Impairs Skeletal Muscle Regeneration".
3. Concentraciones altas de VEGF junto con la elevada presencia de M1, promovieron la proliferación celular pero inhiben la diferenciación celular (menos miotubos).	Saclier, 2013: "Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal Muscle Regeneration".
4. Concentraciones suprafisiológicas de IL-10 en la fase proinflamatoria provocaron disminución del área transversa de las miofibras.	Perdiguero, 2011: "p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair".
5. Evitar la concentración alta de mieloperoxidasa, que puede destruir las membranas de células musculares (abundante en los leucocitos).	Andrade Denapoli, 2016. PRP in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing.

I. Primera infiltración: periodo 24-72 horas. Miogénesis, angiogénesis, neurogénesis y síntesis y depósito de colágeno.

Es posible considerar como **Momento óptimo** al periodo que provoca un efecto positivo del producto sobre uno o varios de los procesos implicados en la regeneración del tejido (36). A nivel práctico, se puede considerar como el Momento de infiltración que provoca el menor tiempo de baja deportiva. Durante el desarrollo del estudio, la intención fue evaluar si los resultados positivos observados con en el uso de PRP en laboratorio y en animales (174) son reproducibles o no en el ámbito de las lesiones musculares en el deporte, y comparar los resultados con los ensayos aleatorizados publicados.

Con la infiltración de PRP Puro realizada entre las 24 y 72 horas tras la lesión muscular se han observado buenos resultados, con **menor tiempo de baja deportiva en comparación con el uso de homeopatía**. Las numerosas acciones positivas asociadas al PRP en la regeneración muscular, parecen estar potenciadas, en mayor o menor medida, con este periodo elegido para la infiltración: miogénesis (63), angiogénesis (37), neurogénesis (38) y síntesis y depósito del tejido conectivo extracelular (39, 40) (Tabla 4).

A pesar de que no se conocen con exactitud los mecanismos que regulan el paso de una fase de predominio de proliferación de las células satélite frente a otra de diferenciación, este paso parece clave para recuperar la estructura del tejido. Ono y colaboradores, en el 2015, asociaron el estado de proliferación de las células satélite a la expresión baja de la proteína de membrana Scrib, importante en las uniones celulares (62). Su acumulación progresiva en la membrana de la célula inhibe la proliferación y promueve la progresión de la miogénesis. El PRP Puro puede promover tanto la proliferación de las células satélite, que irán sintetizando proteínas, dividiéndose y acumulando la proteína Scrib, como su diferenciación y fusión en miofibras. Probablemente, esta doble acción depende de la fase en la que se encuentre cada célula satélite. Un momento adecuado de la infiltración puede ser con una proliferación inicial en multitud de células satélite, a la vez que muchas otras se encuentren en el proceso de diferenciación hacia miofibras.

Los resultados obtenidos con la infiltración entre las 24-72 horas están alineados con otros resultados expuestos, como los presentados por Wright-Carpenter (150), que infiltró suero autólogo condicionado en un modelo con ratones a las 2, 24 y 48 horas de provocar una lesión muscular, comparándolo con un grupo control. En la histología observó mejores resultados con la infiltración a las 24 horas, con mayor activación de las células satélite a las 30/48 horas y un mayor diámetro de las miofibras a los 7 días.

Como uno de los principales mecanismos de acción, cabe destacar el trabajo de Scully y colaboradores, del año (2018) (63), donde describen el eje molecular PDGF/VEGF – Cyclin D1 – MyoD - Scrib – Myogenin como el mecanismo que acelera la regeneración después de la lesión muscular aguda. Destacaron la importancia de los niveles altos locales tanto de PDGF como de VEGF, en una acción sinérgica.

II. Segunda infiltración: transcurridos 9 días. Diferenciación tardía y remodelación del tejido conectivo.

La infiltración de PRP Puro realizada 9 días después de la lesión tuvo como objeto favorecer el proceso de fusión de los miotubos y el crecimiento de las miofibras (diferenciación tardía) (63), y continuar con el depósito y remodelación del tejido conectivo. Los resultados obtenidos orientan a que es posible que estén mejorados estos procesos.

En el año 2016, Denapoli y colaboradores publicaron un estudio en el que se provocó una contusión en el músculo tibial anterior de 30 ratones, y se inyectó PRP Puro en diferentes momentos (días 1, 4 o 7). A los 30 días, se apreció en el grupo tratado el 7º día mayor rendimiento físico en cinta y mayor número de fibras nucleadas (119). Hay que tener prudencia a la hora de extrapolar estos resultados a los humanos, pero orientan a que la infiltración transcurridos varios días puede ser beneficiosa.

En el año 2019, en una serie de interesantes estudios de laboratorio, Scully et al (63), estudiaron el efecto de la exposición diaria al contenido plaquetario y la diferenciación de los mioblastos (expresión de Myogenin, formación de miotubos y número total de núcleos en las miofibras). La exposición diaria durante 9 días (periodo 0-9), provocó inhibición de la fusión de los progenitores de las miofibras (mioblastos/miocitos). En cambio, la diferenciación mejoró con la exposición durante el periodo de días 5-12, cuando los miocitos ya estaban fusionados (diferenciación tardía), produciéndose mayor formación de miotubos y desarrollo de las miofibras (aceleración de la regeneración muscular).

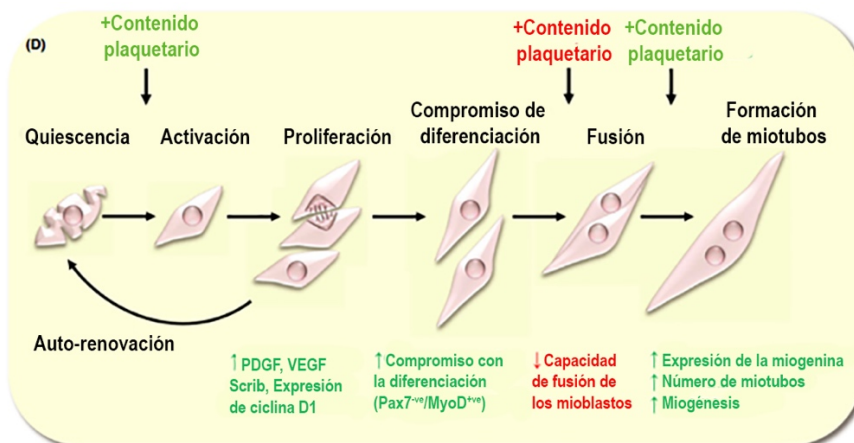


Figura 41 - Exposición al contenido plaquetario después de la fusión de los mioblastos. Provoca el aumento de la formación de miotubos en las miofibras. Scully, 2019.

Por otro lado, la misma molécula puede actuar de manera positiva en diferentes etapas de la miogénesis. Esto ocurre, por ejemplo, con el factor de crecimiento IGF-1 (127), que favorece tanto la proliferación de las células satélite (regeneración precoz; se libera por macrófagos M1), como el crecimiento de las miofibras (regeneración tardía; liberado por fibroblastos) (41).

Tabla 23 - Bases para el uso de una segunda infiltración. Diferenciación tardía, crecimiento de las miofibras y modificaciones en el tejido conectivo.

DIFERENCIACIÓN CELULAR TARDÍA Y CRECIMIENTO. SINTESIS, DEPÓSITO Y REMODELACIÓN DE TEJIDO CONECTIVO	REFERENCIAS
1. La exposición al contenido plaquetario durante el periodo 5-12 días provocó la formación de miotubos y el desarrollo de las miofibras.	Scully, 2019: "Platelet releasate promotes skeletal myogenesis by increasing muscle stem cell commitment to differentiation and accelerates muscle regeneration following acute injury"
2. El tratamiento con PRP el día 7 provocó mayor contenido de fibras nucleadas y mayor rendimiento físico (grupos de ratones tratados con PRP los días 1, 3 o 7 tras la lesión).	Denapoli, 2016: "Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing"
3. LA IGF-1 favorece el crecimiento de las nuevas miofibras formadas tras la lesión muscular.	Lu-Haiyan, 2011 "Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury"

5.2.2 MOMENTO Y EDAD

Tal y como se ha destacado en los resultados, la Edad modifica el efecto del Momento de la infiltración en la baja deportiva.

Los cambios en el Momento tienen mayor repercusión en los jugadores más veteranos y en los más jóvenes, siendo el Momento óptimo:

- Para mayores de 25 años, la infiltración debe ser **precoz**, a las 24 horas.
- Para menores de 25 años, la infiltración debe ser **diferida**, a las 72 horas.
- Para los jugadores de 25 años: escasa repercusión del Momento. La baja deportiva estimada es constante.

La descripción de esta interacción Momento de la infiltración y Edad representa un hallazgo novedoso. Para intentar explicarlo desde una perspectiva biológica es necesario analizar las características del tejido lesionado (144, 168), evaluando las posibles variaciones en las células o en el tejido intersticial muscular que puedan estar asociadas a cambios en variables como la edad o los antecedentes de lesiones previas. Existe una dificultad en este sentido, porque los estudios publicados que analizan la regeneración muscular y la edad comparan, en la gran mayoría de casos, animales o personas de edades extremas, por lo que es difícil comparar esos resultados cuando existen diferencias de edad pequeñas.

Se ha observado una disminución de la capacidad regenerativa del músculo con la edad avanzada, asociada a factores como la disminución del número de células satélite y la pérdida de la capacidad reguladora del sistema inmune (190). También fue evaluado el proceso regenerativo en injertos musculares entre ratones jóvenes y viejos (288), y se encontró que la respuesta inflamatoria, la neovascularización y la miogénesis estaban retrasadas con la edad, aunque sin efecto relevante en el proceso global regenerativo. En este sentido, McGeachie y Grounds (289) observaron que el tiempo de replicación máxima de mioblastos se retrasó entre 26 y 36 horas en ratones viejos en comparación con los jóvenes. Estos datos podrían orientar hacia una actuación exógena precoz en los más veteranos para potenciar la proliferación celular, pero hay que tener en cuenta que estos estudios se realizan en ratones, con edades extremas y con una dudosa relevancia en el efecto final. Y no está claro como afectaría esa infiltración precoz en el proceso de diferenciación.

Se analizan a continuación distintas publicaciones que pueden **relacionar la recuperación de la función y estructura del músculo lesionado con la edad**, para poder comprender la interacción Edad-Momento.

I. Recuperación funcional: fuerza

En el artículo citado de Vicens-Bordas y colaboradores (279), otro hallazgo relevante fue que encontraron una asociación entre el **aumento de la edad y la disminución de la fuerza**

excéntrica de los isquiotibiales en jugadores de fútbol no profesionales. Analizan 284 jugadores, de los que 56 (casi un 20%) se lesionaron en la temporada previa, y casi la mitad lo hicieron con una duración superior a las tres semanas. En la evaluación de la fuerza de todos los jugadores durante la pretemporada, además de una disminución de la fuerza en aquellos que tuvieron previamente lesiones de larga duración, encontraron un 0,9% de disminución de la fuerza por cada año de aumento en la edad. Esta asociación es relevante, especialmente si se comparan valores extremos. Una diferencia, por ejemplo, de 10 años, supone una fuerza menor en el veterano en un 9%. Estos hallazgos pusieron de manifiesto diferencias funcionales a nivel muscular entre jugadores con edades separadas por unos pocos años. En consecuencia, también podrían existir diferencias en el proceso de regeneración muscular con pequeñas diferencias de edad, tal y como se ha reflejado en los resultados del presente estudio.

II. Regeneración del tejido y “memoria molecular”.

Clásicamente, la actividad de los linfocitos T, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se asociaba a la respuesta inmune innata (“inespecífica”). Pero en los últimos años, se ha demostrado que esa respuesta también puede ser específica, y con un papel relevante en la regeneración tisular.

Macrófagos.

Netea, en el 2011, acuñó el término “**inmunidad entrenada**”, para describir la memoria de la defensa innata del huésped asociada a los macrófagos y a las células Natural Killer (193). En la misma línea, Weavers y colaboradores, en el 2016, desarrollan un modelo embrionario de mosca *Drosophila*, demostrando que la fagocitosis de cuerpos apoptóticos en tejidos infectados produce una **memoria inmunológica** en los macrófagos (290). Lo asociaron a un aumento de la síntesis y presentación del receptor Draper, responsable de la fagocitosis de células apoptóticas (291), lo que supone una preparación celular para futuras infecciones. En un extraordinario artículo del año 2017 y en la misma línea argumental, Tidball considera que la ruptura de miofibras, su necrosis y la posterior fagocitosis, podría provocar una **memoria molecular o inmunológica en los macrófagos**, con la presentación de determinados antígenos (41). Hay que tener en consideración que los macrófagos residentes en tejidos pueden tener una vida media de varios años (44).

Basándonos en esta información, se podría especular que las diferencias encontradas en el ensayo aleatorizado presentado, sobre los diferentes momentos óptimos en relación con la Edad del jugador, podrían en parte basarse en esa memoria molecular. Los jugadores con más edad han tenido más años de exposición al juego, y en consecuencia, es habitual una mayor cantidad de lesiones musculares severas previas. Esto podría implicar el desarrollo de una memoria inmunológica específica, lo que supondría una **respuesta inmune adaptativa en la lesión muscular** (inmunidad específica, de tipo celular, mediada por Linfocitos T). El resultado

puede ser una respuesta precoz del sistema inmune tras la lesión, facilitando un proceso rápido de fagocitosis y el inicio de la miogénesis. Podrían ser necesarios estímulos exógenos precoces: infiltración precoz del PRP Puro en los jugadores “veteranos”.

Linfocitos T reguladores.

En el año 2013, Burzyn y colaboradores describen en ratones una población especial de Linfocitos T reguladores en el músculo (LTreg), con características fenotípicas y funcionales propias. Se acumulan rápidamente a nivel local tras la lesión, potenciando la reparación muscular (273). La secuenciación de sus receptores (T cell Receptor o TCR), capaces de reconocer específicamente un determinado antígeno, demostró que eran distintos a los presentados por otros linfocitos T del músculo o de órganos linfoides (273). Este hallazgo sugiere la existencia de un tipo de **antígeno específico de la lesión muscular** que podría ser reconocido por los LT reguladores propios del músculo (41). Podrían reconocer esos antígenos específicos de la lesión, asociados a otra células, como los macrófagos. Esta actuación podría ser considerada como una respuesta inmune adaptativa en la lesión muscular.

En resumen, se podría especular que en los jugadores más veteranos existe una memoria inmunológica de los macrófagos y que podría favorecer una respuesta precoz y efectiva por parte del sistema inmune, hacia un ambiente regenerativo, con acciones como el reclutamiento y proliferación de LTreg y una proliferación y diferenciación de las células satélite probablemente más precoces. La infiltración precoz (a las 24 horas) podría potenciar esa situación. En los jugadores más jóvenes, la proliferación podría ser algo más lenta (sin respuesta inmune adaptativa) y podría ser positivo favorecer la proliferación y diferenciación con una infiltración diferida (a las 72 horas), tal y como indican los resultados presentados en este estudio.

Es posible que existan otras variables asociadas a la Edad que condicionen la capacidad regenerativa del tejido. Las nuevas investigaciones que se desarrollen a lo largo de los próximos años progresaran en un mejor entendimiento de estas bases biológicas.

Tabla 24 - Memoria molecular tras la lesión muscular.
Es posible especular que existe una respuesta inmune adaptativa en la lesión muscular.

CÉLULAS	RESPUESTA ADAPTADA A LA LESIÓN MUSCULAR (MEMORIA MOLECULAR)	REFERENCIAS
1) MACRÓFAGOS	Existe una memoria asociada a la defensa innata del huésped: "inmunidad entrenada" . Se relaciona con los macrófagos y las células Natural Killer.	Netea, 2011. "Trained immunity: a memory for innate host defense".
	La fagocitosis de cuerpos apoptóticos en tejidos infectados produce una memoria inmunológica en los macrófagos, mediante la expresión de receptores específicos.	Weavers, 2016. "Corpse engulfment generates a molecular memory that primes the macrophage inflammatory response".
	La ruptura de membranas celulares en tejido muscular estéril, la necrosis de las miofibras y su posterior fagocitosis, pueden producir una memoria molecular en los macrófagos.	Tidball, 2017. "Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system".
2) LINFOCITOS T reguladores	Linfocitos con características fenotípicas y funcionales propias que potencian la regeneración muscular .	Burzyn, 2013. "A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair".
	La secuenciación de sus receptores TCR demostró que son receptores específicos, lo que sugiere la existencia de un antígeno específico en la lesión muscular .	Tidball, 2017. "Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system".

5.2.3 LIMITACIONES Y FORTALEZAS

Limitaciones. La investigación realizada no explica la totalidad de la variabilidad en los días de baja deportiva. Hay factores no analizados que pueden tener relevancia en la regeneración del tejido y en la baja deportiva, como el tipo de rehabilitación realizada (33), (292), las características psicológicas del deportista o su alimentación. Tampoco se registró la actividad diaria de cada jugador durante su recuperación, lo que puede influir en el Tiempo de Recuperación. Y no existe un tercer grupo sin infiltración, lo que podría ser de ayuda en el análisis comparativo entre los grupos.

Fue registrado el dolor sentido durante el día previo a cada infiltración, pero muchos de los jugadores tomaron analgésicos previamente y no pudo evaluarse adecuadamente la relación entre la infiltración y la evolución del dolor.

Por último, cabe destacar que no se realizaron biopsias musculares. Puede ser la prueba más adecuada para la objetivación de modificaciones estructurales del tejido, aunque de difícil aplicación en deportistas.

Fortalezas. Se realizó un estudio de intervención con dos grupos paralelos, aleatorizado y ciego para el paciente y en el análisis de datos. Es controlado con un producto homeopático. La totalidad de los participantes fueron futbolistas federados, y todas las lesiones se localizaron en los músculos isquiotibiales. Los criterios de alta médica fueron similares para todos los participantes. El PRP empleado fue caracterizado, y fue registrado el momento de la infiltración en horas transcurridas desde la lesión. Las variables independientes utilizadas en el estudio explican el 49% de la variabilidad en la baja deportiva ($R^2 = 0,49$), con un nivel de significación de $p=0,0002$. Por lo tanto, los resultados obtenidos son consistentes, indicando que existen diferencias en la baja deportiva debido a los factores estudiados.

Es necesario registrar las **variables con capacidad de influir en la baja deportiva**, establecer un **protocolo en el uso del PRP** y aplicar a todos los pacientes los **mismos criterios de alta médica**. De este modo, se podrán comparar distintos estudios, y seguir avanzando en el tratamiento de la lesión muscular aguda con PRP.

En base a los resultados positivos obtenidos en esta investigación y a las publicaciones previas con resultados favorables, junto a la seguridad del procedimiento, esta justificado la realización de ensayos clínicos controlados aplicando PRP Puro en pacientes con lesiones musculares, tanto deportivas como quirúrgicas. También es valorable el uso de PRP Puro en lesiones musculares severas en el ámbito del deporte.

5.3 PROTOCOLO LEZAMA: TRATAMIENTO DE LA LESION MUSCULAR AGUDA CON PRP

El siguiente protocolo representa una **propuesta de registro de datos, protocolo de uso y criterios de alta médica** en el tratamiento de la lesión muscular aguda con PRP Puro.

1. PRIMERA PARTE: REGISTRO DE DATOS

Se deben tener en cuenta aquellos factores que pueden influir en el Tiempo de Recuperación. Los principales factores que pueden modificar los días de baja deportiva han sido comentados a lo largo del presente trabajo. Se presentan los datos que pueden ser más relevantes, tanto en relación con el jugador (Edad, tipo de Lesión), con el tratamiento (descripción completa del PRP) y con los criterios de alta médica.

I. PACIENTE

*Edad. Peso. Altura.

- Pierna lesionada / Dolor sentido al lesionarse (1-10)

*Lesiones musculares previas:

Localización.

Tiempo de baja deportiva: <= 10 días / 11-20 días / >= 21 días

- Hábitos tóxicos: tabaco / alcohol

- Enfermedades: diabetes / otras

II. LESIÓN

- Músculo lesionado.

- Localización anatómica: proximal / media / distal

*Localización histológica: intramuscular o miofascial / miotendinosa / tendinosa

- Clasificación:

Ecográfica. Consenso-Munich: 3A (lesión parcial menor) / 3B (lesión parcial moderada)

RMN. Británica: lesión severa 3a (miofascial) / 3b (miotendinosa) / 3c (intratendinosa)

III. CARACTERIZACIÓN DEL PRP: obtención, composición y aplicación.

A continuación, se expone el protocolo de registro de datos fundamentales, basado en la clasificación de Kon y colaboradores. Cabe destacar la importancia que se le da aquí al registro

del Momento de la Infiltración. Queda reflejado en horas, y dividido en periodos de 8 horas, como dato orientativo. Se deben registrar las horas exactas transcurridas desde la lesión hasta la infiltración.

***Obtención:**

Volumen de sangre extraída / volumen de anticoagulante (citrato sódico / EDTA)

***Volumen de PRP obtenido**

Activación: no / si (cloruro cálcico / trombina / otros)

***Composición:**

Plaquetas / leucocitos neutrófilos / glóbulos rojos

***Codificación.**

***Aplicación:**

***Volumen de PRP infiltrado** (vs volumen obtenido):

- pequeño (≤ 5 ml) / intermedio (6-9 ml) / \geq grande (9 ml)

Dosis plaquetaria: Concentración plaquetaria x Volumen infiltrado

*Número de infiltraciones. Intervalo de tiempo entre infiltraciones (días).

***Momento:** horas desde la lesión hasta la infiltración:

- **24h/ 32h/ 40h/ 48h/ 56h/ 64h/ 72h.**

Técnica: intralesional / perilesional / drenaje-hematoma / microperforaciones

2. SEGUNDA PARTE: TRATAMIENTO CON PRP PURO

En base a los estudios publicados y a los resultados obtenidos en el ensayo presentado, se realiza a continuación una **propuesta de tratamiento con PRP Puro en las lesiones musculares agudas**.

El objetivo es posibilitar la **reproducibilidad** del tratamiento y la **comparación** con otros estudios, para mejorar el protocolo de obtención, composición y aplicación del PRP. De este modo, será posible mejorar la eficacia terapéutica del PRP, con disminución de los días de baja deportiva y recuperación de la estructura previa a la lesión.

A continuación, se resumen las características principales del “protocolo Lezama” para la aplicación de PRP Puro, desarrollado en base al estudio presentado:

Obtención: sistema que permita una correcta separación en fases (mediante centrifugación única u otras opciones), lo que posibilita la obtención de un PRP Puro.

Composición:

- **Concentración moderada de plaquetas (2-3 veces la concentración sanguínea) o alta (4-5 veces)**

- **PRP Puro:** concentración de glóbulos rojos menor a $1 \times 10^6/\mu\text{L}$ y concentración de leucocitos menor a la concentración basal en sangre periférica. (Kon, 2020) (132).

Aplicación:

- Uso de **la totalidad del PRP obtenido**, en un volumen intermedio (6-9 ml) o grande (mayor de 9 ml).
- **MOMENTO DE APLICACIÓN** (horas transcurridas).

El efecto del producto depende del Momento de la Infiltración, y la Edad modifica el efecto del Momento. Por estos motivos, existe un Momento Óptimo para la infiltración de PRP Puro, especialmente para los jugadores de menor y mayor edad:

- Para los jugadores **“veteranos”** (mayores de 25 años) debe ser **precoz**, a las 24 horas.
- Para los jugadores **más jóvenes** (menores de 25 años) debe ser **diferido**, a las 72 horas.
- Para los jugadores de 25 años: escasa repercusión del Momento. La baja deportiva estimada es constante.

3. TERCERA PARTE: ALTA MÉDICA

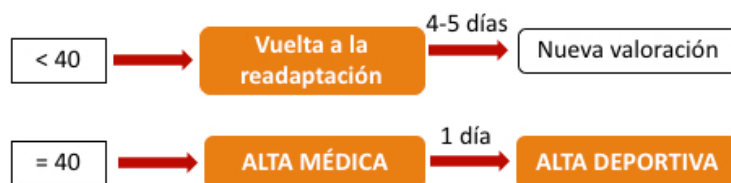
Los **criterios de alta médica** han de ser similares para todos los pacientes. A continuación, se exponen los criterios que se emplearon en la investigación, y que pueden servir como referencia para otros estudios.

Tabla 25 - Criterios de alta médica.

CRITERIOS DE ALTA MÉDICA			
Primera parte			
VARIABLES	TEST	PUNTUACIÓN	
1) IMAGEN ECOGRÁFICA	Exploración ecográfica (incluido el modo doppler).	Mejoría	20
		Hiperemia (doppler)	10
		Hematoma	0
2) AUTOPERCEPCIÓN	Cuestionario con 10 preguntas. Valoraciones entre 1-5 puntos.	≥ 40	20
		35-39	10
		< 35	0
3) FLEXIBILIDAD	ROM de cadera: flexión pasiva en supino con pierna en extensión.	Asimetría $< 10\%$	20
		Asimetría 10-20%	10
		Asimetría $> 20\%$	0
4) FUERZA ISOMÉTRICA	Flexión de rodilla en prono contra resistencia a 15° . Dinamómetro manual.	Asimetría $< 10\%$	20
		Asimetría 10-20%	10
		Asimetría $> 20\%$	0
5) ADAPTACIÓN AL JUEGO	1. Conducción y regate. 2. Pase: corto y largo. 3. Recepción y remate.	Tres apartados	20
		Dos apartados	10
		Un apartado	0



CRITERIOS DE ALTA MÉDICA Segunda parte			
VARIABLES	TEST	PUNTUACIÓN	
6) DISTANCIA	Triple salto unipodal	Asimetría <10%	20
		Asimetría >10%	0
7) VELOCIDAD	Tiempo empleado en recorrer 20 metros. Dos repeticiones.	Sin dolor	20
		Con dolor	0



La fecha final de la **baja deportiva** se fija el día de la vuelta al entrenamiento o competición sin restricción. El total de días para la recuperación se obtiene con el registro de la fecha de la lesión y la fecha final de la baja deportiva.

6 CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. **El efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración y de la Edad.** Para disminuir la baja deportiva, es necesario considerar las tres variables (Producto, Momento y Edad) de forma conjunta.
2. **La diferencia entre las bajas deportivas estimadas para cada producto es mayor cuanto más se retrasa la infiltración, y favorable al uso de PRP Puro.** Esta diferencia aumenta en 0,11 días por cada hora transcurrida entre la lesión y el tratamiento.
3. **La infiltración de PRP Puro puede disminuir la baja deportiva, eligiendo el Momento de infiltración en función de la Edad.**
 - A las 24 horas, para mayores de 25 años.
 - A las 72 horas, para menores de 25 años.
 - El Momento tiene escasa repercusión para jugadores de 25 años: la baja deportiva estimada es constante. Tiene gran repercusión en los jugadores más veteranos y en los más jóvenes.
4. **La lesión de la Unión Miotendinosa (UMT) tiene peor pronóstico que la intramuscular y la miofascial.** En igualdad de Producto, Momento y Edad, la baja deportiva es superior en $7,9 \pm 5,2$ días.
5. **El Modelo obtenido tiene capacidad predictiva para la baja deportiva.** Conociendo el Tipo de Lesión y la Edad del jugador, y aplicando PRP Puro en un Momento concreto, es posible estimar el Tiempo de Recuperación con un error absoluto medio de 5,4 días.
6. **Las fuentes de variabilidad analizadas en este estudio** (tipo de Lesión, Edad y las interacciones Producto-Momento y Edad-Momento) **explican el 49% de la variabilidad en la baja deportiva** ($R^2 = 0,49$).

Tabla 26 - Conclusiones.

CONCLUSIONES	APLICACIONES PRÁCTICAS	LIMITACIONES	LINEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN
1) El efecto de cada Producto en la baja deportiva depende del Momento de la infiltración y de la Edad.	- Registro en HORAS del tiempo transcurrido entre la la lesión muscular y la infiltración.	No existen ensayos aleatorizados previos analizando el efecto de la interacción Producto-Momento.	Desarrollo de PROTOCOLOS de aplicación de PRP en el músculo.
2) La diferencia entre las bajas deportivas estimadas para cada producto es mayor cuanto más se retrasa la infiltración, y favorable al PRP Puro.	- Caracterización global del PRP: obtención, composición y aplicación. - Uso de PRP Puro en la lesión muscular.	La comparación con ensayos aleatorizados previos esta muy limitada: no caracterizaron el PRP (en 3 de 7 estudios) o era leuco enriquecido (en 2 de 4).	Uso de PRP Puro en las lesiones musculares agudas de deportistas y de pacientes operados.
3) La infiltración de PRP Puro puede disminuir la baja deportiva, eligiendo el Momento de la infiltración en función de la Edad.	- Optimizar el Momento: • A las 24h, mayores de 25 años. • A las 72h, menores de 25 años. • Escasa repercusión del Momento a los 25 años.	No hay artículos relevantes que comparen la regeneración muscular en animales o personas con pequeñas diferencias de edad.	Respuesta inmune adaptativa en la lesión muscular: "memoria molecular".
4) La lesión de la Unión Miotendinosa tiene peor pronóstico.	- Informar al jugador y su entorno del pronóstico asociado al tipo de lesión.	El diagnóstico ecográfico de la lesión puede ser difícil en algunos casos.	Recidivas de cada tipo de lesión tras el tratamiento.
5) El Modelo obtenido tiene capacidad predictiva para la baja deportiva.	- Estimar la baja deportiva considerando tipo de Lesión, Producto, Momento y Edad.	Existen factores no analizados que pueden tener relevancia en el Tiempo de Recuperación.	Comprobación de la capacidad predictiva del modelo.
6) Las fuentes de variabilidad del Modelo explican el 49% de la variabilidad en la baja deportiva.	- Estimar la baja deportiva. - Disminuir la baja deportiva. - Evitar el retorno precoz.	Existen factores no analizados que pueden tener relevancia en el Tiempo de Recuperación.	Registro y análisis de otras variables que pueden ser introducidas en el Modelo.

En un futuro cercano, se desarrollarán estudios empleando PRP en lesiones musculares agudas asociadas a procesos quirúrgicos, como la cirugía protésica de rodilla y de cadera. En estos casos, en el contexto de un periodo largo de convalecencia que puede ser mejorado, será viable el empleo de biopsias musculares semanas después de las infiltraciones, para intentar objetivar el efecto del tratamiento en la regeneración tisular.

En el caso de emplear PRP Puro para el tratamiento de una lesión aguda, se debe considerar conjuntamente el momento de aplicación y las características biológicas del tejido. De este modo, avanzaremos en el desarrollo de protocolos de aplicación de PRP que mejoren los resultados.

7 BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS

1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcified Tissue International*. 2015;96(3):183-95.
2. Sweeney HL HD. Muscle contraction. 2018.
3. Gillies AR, Chapman MA, Bushong EA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Lieber RL. High resolution three-dimensional reconstruction of fibrotic skeletal muscle extracellular matrix. *Journal of Physiology-London*. 2017;595(4):1159-71.
4. Dunn A, Marcinczyk, M. , Talovic, M. , KrishnaPatel, K. , Haas, G. , Garg, K. Role of Stem Cells and Extracellular Matrix in the Regeneration of Skeletal Muscle. *Muscle Cell and Tissue*2018.
5. Gordon MK, Hahn RA. Collagens. *Cell and Tissue Research*. 2010;339(1):247-57.
6. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*. 2017;356(6342):1026-30.
7. Sciorati C, Rigamonti E, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death and Differentiation*. 2016;23(6):927-37.
8. Andia I, Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013;9(12):721-30.
9. Liu W, Chakkalakal JV. The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions. *Myogenesis in Development and Disease*. 2018;126:99-124.
10. Iriarte Posse Í. *Ecografía musculoesquelética*: Editorial Panamericana; 2019.
11. Stepien K, Smigielski R, Mouton C, Cizek B, Engelhardt M, Seil R. Anatomy of proximal attachment, course, and innervation of hamstring muscles: a pictorial essay. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*. 2019;27(3):673-84.
12. Askling CM, Tengvar M, Saartok T, Thorstensson A. Acute first-time hamstring strains during high-speed running - A longitudinal study including clinical and magnetic resonance imaging findings. *American Journal of Sports Medicine*. 2007;35(2):197-206.
13. Jones A, Jones G, Greig N, Bower P, Brown J, Hind K, et al. Epidemiology of injury in English Professional Football players: A cohort study. *Physical Therapy in Sport*. 2019;35:18-22.
14. Larruskain J, Lekue JA, Diaz N, Odriozola A, Gil SM. A comparison of injuries in elite male and female football players: A five-season prospective study. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2018;28(1):237-45.

15. Silva JR, Rumpf MC, Hertzog M, Castagna C, Farooq A, Girard O, et al. Acute and Residual Soccer Match-Related Fatigue: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Medicine*. 2018;48(3):539-83.
16. Grassi A, Quaglia A, Canata GL, Zaffagnini S. An update on the grading of muscle injuries: a narrative review from clinical to comprehensive systems. *Joints*. 2016;4(1):39-46.
17. Mueller-Wohlfahrt H-W, Haensel L, Mithoefer K, Ekstrand J, English B, McNally S, et al. Terminology and classification of muscle injuries in sport: The Munich consensus statement. *British Journal of Sports Medicine*. 2013;47(6):342-+.
18. Pollock N, James SLJ, Lee JC, Chakraverty R. British athletics muscle injury classification: a new grading system. *British Journal of Sports Medicine*. 2014;48(18):1347-+.
19. Balias R, Alomar X, Pedret C, Blasi M, Rodas G, Pruna R, et al. Role of the Extracellular Matrix in Muscle Injuries: Histoarchitectural Considerations for Muscle Injuries. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2018;6(9).
20. Spanish Soc Sports T. A Histoarchitectural Approach to Skeletal Muscle Injury: Searching for a Common Nomenclature. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2020;8(3).
21. Huygaerts S, Cos F, Cohen DD, Calleja-Gonzalez J, Guitart M, Blazeovich AJ, et al. Mechanisms of Hamstring Strain Injury: Interactions between Fatigue, Muscle Activation and Function. *Sports*. 2020;8(5).
22. Ekstrand J, Walden M, Hagglund M. Hamstring injuries have increased by 4% annually in men's professional football, since 2001: a 13-year longitudinal analysis of the UEFA Elite Club injury study. *British Journal of Sports Medicine*. 2016;50(12):731-+.
23. van der Made AD, Almusa E, Reurink G, Whiteley R, Weir A, Hamilton B, et al. Intramuscular tendon injury is not associated with an increased hamstring reinjury rate within 12 months after return to play. *British Journal of Sports Medicine*. 2018;52(19):1261-6.
24. Eliakim E, Morgulev E, Lidor R, Meckel Y. Estimation of injury costs: financial damage of English Premier League teams' underachievement due to injuries. *Bmj Open Sport & Exercise Medicine*. 2020;6(1).
25. Balias R, Pedret C, Iriarte I, Saiz R, Cerezal L. Sonographic landmarks in hamstring muscles. *Skeletal Radiology*. 2019;48(11):1675-83.
26. Cruz J, Mascarenhas V. Adult thigh muscle injuries-from diagnosis to treatment: what the radiologist should know. *Skeletal Radiology*. 2018;47(8):1087-98.
27. Prakash A, Entwisle T, Schneider M, Brukner P, Connell D. Connective tissue injury in calf muscle tears and return to play: MRI Correlation. *British Journal of Sports Medicine*. 2018;52(14):929-+.
28. Schneider-Kolsky ME, Hoving JL, Warren P, Connell DA. A comparison between clinical assessment and magnetic resonance imaging of acute hamstring injuries. *American Journal of Sports Medicine*. 2006;34(6):1008-15.

29. Ekstrand J, Askling C, Magnusson H, Mithoefer K. Return to play after thigh muscle injury in elite football players: implementation and validation of the Munich muscle injury classification. *British Journal of Sports Medicine*. 2013;47(12):769-74.
30. Entwisle T, Ling Y, Splatt A, Brukner P, Connell D. Distal Musculotendinous T Junction Injuries of the Biceps Femoris: An MRI Case Review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2017;5(7).
31. Comin J, Malliaras P, Baquie P, Barbour T, Connell D. Return to Competitive Play After Hamstring Injuries Involving Disruption of the Central Tendon. *American Journal of Sports Medicine*. 2013;41(1):111-5.
32. Hotfiel T, Hoppe MW, Heiss R, Lutter C, Tischer T, Forst R, et al. QUANTIFIABLE CONTRAST-ENHANCED ULTRASOUND EXPLORES THE ROLE OF PROTECTION, REST, ICE (CRYOTHERAPY), COMPRESSION AND ELEVATION (PRICE) THERAPY ON MICROVASCULAR BLOOD FLOW. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2021;47(5):1269-78.
33. Mendiguchia J, Martinez-Ruiz E, Edouard P, Morin J-B, Martinez-Martinez F, Idoate F, et al. A Multifactorial, Criteria-based Progressive Algorithm for Hamstring Injury Treatment. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2017;49(7):1482-92.
34. Gardner T. Fibrosis following Acute Skeletal Muscle Injury: Mitigation and Reversal Potential in the Clinic. *Journal of Sports Medicine* 2020. p. 7.
35. Roman W, Pinheiro H, Pimentel MR, Segales J, Oliveira LM, Garcia-Dominguez E, et al. Muscle repair after physiological damage relies on nuclear migration for cellular reconstruction. *Science (New York, NY)*. 2021;374(6565):355-9.
36. Grounds MD. The need to more precisely define aspects of skeletal muscle regeneration. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;56:56-65.
37. Nolfi AL, Behun MN, Yates CC, Brown BN, Kulkarni M. Beyond Growth Factors: Macrophage-Centric Strategies for Angiogenesis. *Current Pathobiology Reports*. 2020.
38. Zheng C, Zhu Q, Liu X, Huang X, He C, Jiang L, et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on proliferation, neurotrophic function and migration of Schwann cells in vitro. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;10(5):428-36.
39. Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biology*. 2018;68-69:81-93.
40. Gardner T, Kenter K, Li Y. Fibrosis following Acute Skeletal Muscle Injury: Mitigation and Reversal Potential in the Clinic. *Journal of sports medicine (Hindawi Publishing Corporation)*. 2020;2020:7059057-.
41. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2017;17(3):165-78.
42. Borrione P, Grasso L, Chierito E, Geuna S, Racca S, Abbadessa G, et al. Experimental model for the study of the effects of platelet-rich plasma on the early phases of muscle healing. *Blood Transfusion*. 2014;12:S221-S8.

43. Paylor B, Natarajan A, Zhang R-H, Rossi F. NONMYOGENIC CELLS IN SKELETAL MUSCLE REGENERATION. *Current Topics in Developmental Biology: Myogenesis*. 2011;96:139-65.
44. Abul K. Abbas AHL, Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology*. 10th edition ed: Elsevier; 2022.
45. Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi S, Fantini C, Mercatelli N, Racca S, et al. Platelet-Rich Plasma and Skeletal Muscle Healing: A Molecular Analysis of the Early Phases of the Regeneration Process in an Experimental Animal Model. *Plos One*. 2014;9(7).
46. Martins L, Gallo CC, Honda TSB, Alves PT, Stilhano RS, Rosa DS, et al. Skeletal muscle healing by M1-like macrophages produced by transient expression of exogenous GM-CSF. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020;11(1).
47. Sass FA, Fuchs M, Pumberger M, Geissler S, Duda GN, Perka C, et al. Immunology Guides Skeletal Muscle Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(3).
48. Tsai W-C, Yu T-Y, Lin L-P, Lin M-S, Tsai T-T, Pang J-HS. Platelet rich plasma promotes skeletal muscle cell migration in association with up-regulation of FAK, paxillin, and F-Actin formation. *Journal of Orthopaedic Research*. 2017;35(11):2506-12.
49. Ceafalan LC, Popescu BO, Hinescu ME. Cellular Players in Skeletal Muscle Regeneration. *Biomed Research International*. 2014;2014.
50. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 Triggers Changes in Macrophage Phenotype That Promote Muscle Growth and Regeneration. *Journal of Immunology*. 2012;189(7):3669-80.
51. Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, et al. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Science Translational Medicine*. 2014;6(258).
52. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, Magnan M, et al. Differentially Activated Macrophages Orchestrate Myogenic Precursor Cell Fate During Human Skeletal Muscle Regeneration. *Stem Cells*. 2013;31(2):384-96.
53. Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *Comptes Rendus Biologies*. 2007;330(6-7):530-3.
54. Yin H, Price F, Rudnicki MA. SATELLITE CELLS AND THE MUSCLE STEM CELL NICHE. *Physiological Reviews*. 2013;93(1):23-67.
55. Dumon NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*. 2015;142(9):1572-81.
56. Rayagiri SS, Ranaldi D, Raven A, Azhar NIFM, Lefebvre O, Zammit PS, et al. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nature Communications*. 2018;9.

-
57. Boppart MD, Burkin DJ, Kaufman SJ. $\alpha(7)\beta(1)$ -integrin regulates mechanotransduction and prevents skeletal muscle injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006;290(6):C1660-C5.
58. Belizario JE, Fontes-Oliveira CC, Borges JP, Kashiabara JA, Vannier E. Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. *Springerplus*. 2016;5.
59. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006;16(5):525-32.
60. Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4(2).
61. Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine*. 2020;12(1).
62. Ono Y, Urata Y, Goto S, Nakagawa S, Humbert PO, Li T-S, et al. Muscle Stem Cell Fate Is Controlled by the Cell-Polarity Protein Scrib. *Cell Reports*. 2015;10(7):1135-48.
63. Scully D, Sfyri P, Verpoorten S, Papadopoulos P, Carmen Munoz-Turrillas M, Mitchell R, et al. Platelet releasate promotes skeletal myogenesis by increasing muscle stem cell commitment to differentiation and accelerates muscle regeneration following acute injury. *Acta Physiologica*. 2019;225(3).
64. Zhang Q, Vashisht AA, O'Rourke J, Corbel SY, Moran R, Romero A, et al. The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nature Communications*. 2017;8.
65. Chen B, You W, Wang Y, Shan T. The regulatory role of Myomaker and Myomixer-Myomerger-Minion in muscle development and regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(8):1551-69.
66. Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, Matsuyama S, Nakasa T, Kamei N, et al. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *Febs Letters*. 2015;589(11):1257-65.
67. Yue BL, Yang HY, Wang J, Ru WX, Wu JY, Huang YZ, et al. Exosome biogenesis, secretion and function of exosomal miRNAs in skeletal muscle myogenesis. *Cell Proliferation*. 2020;53(7).
68. Chellini F, Tani A, Zecchi-Orlandini S, Sassoli C. Influence of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on Endogenous Mechanisms of Skeletal Muscle Repair/Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3).
69. Gautam J, Yao Y. Pericytes in Skeletal Muscle. In: Birbrair A, editor. *Pericyte Biology in Different Organs*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 11222019. p. 59-72.
70. Birbrair A, Borges IdT, Gilson Sena IF, Almeida GG, Meirelles LdS, Goncalves R, et al. How Plastic Are Pericytes? *Stem Cells and Development*. 2017;26(14):1013-9.
71. Guimaraes-Camboia N, Cattaneo P, Sun Y, Moore-Morris T, Gu Y, Dalton ND, et al. Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell*. 2017;20(3):345-+.

72. Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, et al. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*. 2016;44(2):355-67.
73. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
74. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.
75. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*. 2017;6(6):1445-51.
76. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT (R)) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1019-24.
77. Sassoli C, Vallone L, Tani A, Chellini F, Nosi D, Zecchi-Orlandini S. Combined use of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) and platelet rich plasma (PRP) stimulates proliferation and differentiation of myoblasts in vitro: new therapeutic perspectives for skeletal muscle repair/regeneration. *Cell and Tissue Research*. 2018;372(3):549-70.
78. Contreras O, Rossi FMV, Theret M. Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors-time for new definitions. *Skeletal Muscle*. 2021;11(1).
79. Munoz-Canoves P, Serrano AL. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015;26(9):449-50.
80. Serrano AL, Munoz-Canoves P. Mouse Models of Muscle Fibrosis. *MYOFIBROBLASTS: Methods and Protocols*. 2021;2299:357-70.
81. Li H, Hicks JJ, Wang L, Oyster N, Philippon MJ, Hurwitz S, et al. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor beta 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials*. 2016;87:147-56.
82. Safi HA, Nagalingam RS, Czubryt MP. Scleraxis: a force-responsive cell phenotype regulator. *Current Opinion in Physiology*. 2018;1:104-10.
83. Maruyama N, Hirano F, Yoshikawa N, Migita K, Eguchi K, Tanaka H. Thrombin stimulates cell proliferation in human fibroblast-like synoviocytes in nuclear factor-kappa B activation and protein kinase C mediated pathway. *Journal of Rheumatology*. 2000;27(12):2777-85.
84. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011;105:S13-S33.
85. Smyth SS, McEver RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, et al. Platelet physiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(11):1759-66.

-
86. Gimbrone MA, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. PRESERVATION OF VASCULAR INTEGRITY IN ORGANS PERFUSED IN VITRO WITH A PLATELET-RICH MEDIUM. *Nature*. 1969;222(5188):33-+.
87. Hanson SR, Slichter SJ. PLATELET KINETICS IN PATIENTS WITH BONE-MARROW HYPOPLASIA - EVIDENCE FOR A FIXED PLATELET REQUIREMENT. *Blood*. 1985;66(5):1105-9.
88. Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009;7(2):241-6.
89. Zhao Y, Chen MM, Lian D, Li Y, Wang JH, Deng SL, et al. Non-Coding RNA Regulates the Myogenesis of Skeletal Muscle Satellite Cells, *Injury Repair and Diseases*. *Cells*. 2019;8(9).
90. Lindsay CR, Edelstein LC. MicroRNAs in Platelet Physiology and Function. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2016;42(3):215-22.
91. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(6):426-37.
92. Bordoli MR, Yum J, Breitkopf SB, Thon JN, Italiano JE, Jr., Xiao J, et al. A Secreted Tyrosine Kinase Acts in the Extracellular Environment. *Cell*. 2014;158(5):1033-44.
93. Yadav S, Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships. *Platelets*. 2017;28(2):108-18.
94. Lee MM, Nasirikenari M, Manhardt CT, Ashline DJ, Hanneman AJ, Reinhold VN, et al. Platelets Support Extracellular Sialylation by Supplying the Sugar Donor Substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(13):8742-8.
95. Wandall HH, Rumjantseva V, Sorensen ALT, Patel-Hett S, Josefsson EC, Bennett EP, et al. The origin and function of platelet glycosyltransferases. *Blood*. 2012;120(3):626-35.
96. Torreggiani E, Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Baglio SR, Baldini N. EXOSOMES: NOVEL EFFECTORS OF HUMAN PLATELET LYSATE ACTIVITY. *European Cells & Materials*. 2014;28:137-51.
97. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016;76:371-87.
98. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet alpha-granules. *Blood*. 2011;118(5):1370-3.
99. Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 2012;120(26):5209-16.
100. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*. 2008;111(3):1227-33.
101. Klement GL, Yip TT, Cassiola F, Kikuchi L, Cervi D, Podust V, et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood*. 2009;113(12):2835-42.

102. Taylor VL, Spencer EM. Characterisation of insulin-like growth factor-binding protein-3 binding to a novel receptor on human platelet membranes. *Journal of Endocrinology*. 2001;168(2):307-15.
103. Whitham M, Febbraio MA. The ever-expanding myokinome: discovery challenges and therapeutic implications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;15(10):719-29.
104. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(12):2141-51.
105. Schaer MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nestic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2015;473(5):1635-43.
106. Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H. THE EXOCYTOSIS OF HUMAN-BLOOD PLATELETS - A FAST FREEZING AND FREEZE-SUBSTITUTION ANALYSIS. *European Journal of Cell Biology*. 1987;43(2):273-82.
107. Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(1):216-20.
108. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26.
109. Lord MS, Cheng B, Farrugia BL, McCarthy S, Whitelock JM. Platelet Factor 4 Binds to Vascular Proteoglycans and Controls Both Growth Factor Activities and Platelet Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(10):4054-63.
110. Ferreira SB, Jr., Repeke CE, Raimundo FM, Nunes IS, Avila-Campos MJ, Ferreira BR, et al. CCR5 Mediates Pro-osteoclastic and Osteoclastogenic Leukocyte Chemoattraction. *Journal of Dental Research*. 2011;90(5):632-7.
111. Zhang C, Wang C, Li Y, Miwa T, Liu C, Cui W, et al. Complement C3a signaling facilitates skeletal muscle regeneration by regulating monocyte function and trafficking. *Nature Communications*. 2017;8.
112. Sanchez M, Delgado D, Sanchez P, Anitua E, Padilla S. Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. In: Roger B, Guermazi A, Skaf A, editors. *Muscle Injuries in Sport Athletes: Clinical Essentials and Imaging Findings*. Sports and Traumatology 2017. p. 451-64.
113. Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation Research*. 2020;127(2):310-29.
114. Gianni-Barrera R, Di Maggio N, Melly L, Burger MG, Mujagic E, Guerke L, et al. Therapeutic vascularization in regenerative medicine: Concise Review. *Stem Cells Translational Medicine*. 2020;9(4):433-44.

-
115. Gianni-Barrera R, Butschkau A, Uccelli A, Certelli A, Valente P, Bartolomeo M, et al. PDGF-BB regulates splitting angiogenesis in skeletal muscle by limiting VEGF-induced endothelial proliferation. *Angiogenesis*. 2018;21(4):883-900.
116. Armulik A, Genove G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell*. 2011;21(2):193-215.
117. Lodyga M, Hinz B. TGF-beta 1-A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2020;101:123-39.
118. Li H, Usas A, Poddar M, Chen C-W, Thompson S, Ahani B, et al. Platelet-Rich Plasma Promotes the Proliferation of Human Muscle Derived Progenitor Cells and Maintains Their Stemness. *Plos One*. 2013;8(6).
119. Andrade Denapoli PM, Stilhano RS, McNeill Ingham SJ, Han SW, Abdalla RJ. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing. *American Journal of Sports Medicine*. 2016;44(8):1962-71.
120. Miroshnychenko O, Chang W-t, Dragoo JL. The Use of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma to Enhance Differentiation of Skeletal Myoblasts: Implications for the Use of Autologous Blood Products for Muscle Regeneration. *American Journal of Sports Medicine*. 2017;45(4):945-53.
121. van Meeteren LA, ten Dijke P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell and Tissue Research*. 2012;347(1):177-86.
122. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87.
123. Gianni-Barrera R, Trani M, Fontanellaz C, Heberer M, Djonov V, Hlushchuk R, et al. VEGF over-expression in skeletal muscle induces angiogenesis by intussusception rather than sprouting. *Angiogenesis*. 2013;16(1):123-36.
124. Bisciotti GN, Volpi P, Alberti G, Aprato A, Artina M, Auci A, et al. Italian consensus statement (2020) on return to play after lower limb muscle injury in football (soccer). *Bmj Open Sport & Exercise Medicine*. 2019;5(1).
125. Tafuro S, Ayuso E, Zacchigna S, Zentilin L, Moimas S, Dore F, et al. Inducible adeno-associated virus vectors promote functional angiogenesis in adult organisms via regulated vascular endothelial growth factor expression. *Cardiovascular Research*. 2009;83(4):663-71.
126. Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(4):516-27.
127. Lu H, Huang D, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Zhou L. Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *Faseb Journal*. 2011;25(1):358-69.
128. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, et al. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2000(370):272-85.

129. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*. 2000;82B(1):131-7.
130. Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical Oral Investigations*. 2016;20(9):2353-60.
131. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(20).
132. Kon E, Di Matteo B, Delgado D, Cole BJ, Dorotei A, Dragoo JL, et al. Platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis: an expert opinion and proposal for a novel classification and coding system. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2020.
133. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
134. Ehrenfest DMD, Bielecki T, Jimbo R, Barbe G, Del Corso M, Inchingolo F, et al. Do the Fibrin Architecture and Leukocyte Content Influence the Growth Factor Release of Platelet Concentrates? An Evidence-based Answer Comparing a Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP) Gel and a Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF). *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012;13(7):1145-52.
135. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-Rich Plasma: The PAW Classification System. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2012;28(7):998-1009.
136. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports Medicine Applications of Platelet Rich Plasma. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012;13(7):1185-95.
137. Mautner K, Malanga GA, Smith J, Shiple B, Ibrahim V, Sampson S, et al. A Call for a Standard Classification System for Future Biologic Research: The Rationale for New PRP Nomenclature. *Pm&R*. 2015;7(4):S53-S9.
138. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraudo L, et al. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ open sport & exercise medicine*. 2016;2(1):e000060-e.
139. Santos Duarte Lana JF, Purita J, Paulus C, Huber SC, Rodrigues BL, Rodrigues AA, et al. Contributions for classification of platelet rich plasma - proposal of a new classification: MARSPILL. *Regenerative Medicine*. 2017;12(5):565-74.
140. Fadadu PP, Mazzola AJ, Hunter CW, Davis TT. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2019;44(6):652-9.
141. Magalon J, Bausset O, Serratrice N, Giraudo L, Aboudou H, Veran J, et al. Characterization and Comparison of 5 Platelet-Rich Plasma Preparations in a Single-Donor Model. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2014;30(5):629-38.

142. Cetinkaya RA, Eker I, Yilmaz S, Unlu A, Pekel A, Sagkan RI, et al. A NEW METHOD FOR ACTIVATING PLATELETS IN PLATELET-RICH PLASMA TO USE IN REGENERATIVE MEDICINE: A CYCLE OF FREEZING AND THAWING. *Haematologica*. 2016;101:646-.
143. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Research International*. 2016;2016.
144. Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015;15(7):987-99.
145. Borrione P, Di Gianfrancesco A, Pereira MT, Pigozzi F. Platelet-Rich Plasma in Muscle Healing. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2010;89(10):854-61.
146. Kingsley CS. BLOOD COAGULATION - EVIDENCE OF AN ANTAGONIST TO FACTOR-VI IN PLATELET-RICH HUMAN PLASMA. *Nature*. 1954;173(4407):723-4.
147. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disorders*. 2018;4(1):18-24.
148. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 1999;14(4):529-35.
149. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2003;35(10):1648-52.
150. Wright-Carpenter T, Opolon P, Appell HJ, Meijer H, Wehling P, Mir LM. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: Animal experiments using a muscle contusion model. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(8):582-7.
151. Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P, Appell HJ, Mir LM, Wehling P. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: A pilot study on sportsmen with muscle strains. *International Journal of Sports Medicine*. 2004;25(8):588-93.
152. Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Platelet rich plasma therapies for sports muscle injuries: any evidence behind clinical practice? *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2011;11(4):509-18.
153. Acebes-Huerta A, Arias-Fernandez T, Bernardo A, Carmen Munoz-Turrillas M, Fernandez-Fuertes J, Seghatchian J, et al. Platelet-derived bio-products: Classification update, applications, concerns and new perspectives. *Transfusion and Apheresis Science*. 2020;59(1).
154. Sanchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-Rich Therapies in the Treatment of Orthopaedic Sport Injuries. *Sports Medicine*. 2009;39(5):345-54.
155. Grassi A, Napoli F, Romandini I, Samuelsson K, Zaffagnini S, Candrian C, et al. Is Platelet-Rich Plasma (PRP) Effective in the Treatment of Acute Muscle Injuries? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Medicine*. 2018;48(4):971-89.

156. Setayesh K, Villarreal A, Gottschalk A, Tokish JM, Choate WS. Treatment of Muscle Injuries with Platelet-Rich Plasma: a Review of the Literature. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2018;11(4):635-42.
157. Seow D, Shimozone Y, Yusof TNBT, Yasui Y, Massey A, Kennedy JG. Platelet-Rich Plasma Injection for the Treatment of Hamstring Injuries: A Systematic Review and Meta-analysis With Best-Worst Case Analysis. *American Journal of Sports Medicine*. 2020.
158. Belk JW, Kraeutler MJ, Thon SG, Littlefield CP, Smith JH, McCarty EC. Augmentation of Meniscal Repair With Platelet-Rich Plasma: A Systematic Review of Comparative Studies. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2020;8(6).
159. Kon E, Di Matteo B, Altomare D, Iacono F, Kurpyakov A, Lychagin A, et al. Biologic agents to optimize outcomes following ACL repair and reconstruction: A systematic review of clinical evidence. *Journal of Orthopaedic Research*. 2021.
160. Yausep OE, Madhi I, Trigkilidas D. Platelet rich plasma for treatment of osteochondral lesions of the talus: A systematic review of clinical trials. *Journal of Orthopaedics*. 2020;18:218-25.
161. Nie L-y, Zhao K, Ruan J, Xue J. Effectiveness of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Meta-analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2021;9(3).
162. Han J, Gao F, Li Y, Ma J, Sun W, Shi L, et al. The Use of Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head: A Systematic Review. *Biomed Research International*. 2020;2020.
163. Kaux J-F, Emonds-Alt T. The use of platelet-rich plasma to treat chronic tendinopathies: A technical analysis. *Platelets*. 2018;29(3):213-27.
164. Borrione P, Fagnani F, Di Gianfrancesco A, Mancini A, Pigozzi F, Pitsiladis Y. The Role of Platelet-Rich Plasma in Muscle Healing. *Current Sports Medicine Reports*. 2017;16(6):459-63.
165. Zhou Y, Zhang J, Wu H, Hogan MV, Wang JHC. The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6.
166. Rubio-Azpeitia E, Bilbao AM, Sanchez P, Delgado D, Andia I. The Properties of 3 Different Plasma Formulations and Their Effects on Tendinopathic Cells. *American Journal of Sports Medicine*. 2016;44(8):1952-61.
167. Gonzalez-Iglesias J. Therapeutic potential of platelet rich plasma. Reflections on its research and development. *Revista española de cirugía ortopédica y traumatología*. 2013;57(4):237-9.
168. Andia I, Maffulli N. Muscle and Tendon Injuries: The Role of Biological Interventions to Promote and Assist Healing and Recovery. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2015;31(5):999-1015.

-
169. Navani A, Li G, Chrystal J. Platelet Rich Plasma in Musculoskeletal Pathology: A Necessary Rescue or a Lost Cause? *Pain Physician*. 2017;20(3):E345-E56.
170. Straum OK. The optimal platelet concentration in platelet-rich plasma for proliferation of human cells in vitro-diversity, biases, and possible basic experimental principles for further research in the field: A review. *Peerj*. 2020;8.
171. Gorgu M, Gokkaya A, Karanfil E. What Should Be Adequate PRP Dose for an Effective Treatment? An In-Vitro Experimental Study on the Skin. *Aesthetic surgery journal*. 2021.
172. Tsai W-C, Yu T-Y, Lin L-P, Lin M-S, Wu Y-C, Liao C-H, et al. Platelet rich plasma releasate promotes proliferation of skeletal muscle cells in association with upregulation of PCNA, cyclins and cyclin dependent kinases. *Platelets*. 2017;28(5):491-7.
173. McClure MJ, Garg K, Simpson DG, Ryan JJ, Sell SA, Bowlin GL, et al. The influence of platelet-rich plasma on myogenic differentiation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;10(4):E239-E49.
174. Kunze KN, Hannon CP, Fialkoff JD, Frank RM, Cole BJ. Platelet-rich plasma for muscle injuries: A systematic review of the basic science literature. *World Journal of Orthopedics*. 2019;10(7):278-91.
175. Ferrara N. Binding to the Extracellular Matrix and Proteolytic Processing: Two Key Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Growth Factor Action. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(5):687-90.
176. von Degenfeld G, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, et al. Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. *Faseb Journal*. 2006;20(14):2657-+.
177. Del Amo C, Perez-Valle A, Atilano L, Andia I. Unraveling the Signaling Secretome of Platelet-Rich Plasma: Towards a Better Understanding of Its Therapeutic Potential in Knee Osteoarthritis. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(3).
178. O'Donnell C, Migliore E, Grandi FC, Koltsov J, Lingampalli N, Cisar C, et al. Platelet-Rich Plasma (PRP) From Older Males With Knee Osteoarthritis Depresses Chondrocyte Metabolism and Upregulates Inflammation. *Journal of Orthopaedic Research*. 2019;37(8):1760-70.
179. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JAN, Bierma-Zeinstra SMA, et al. Rationale, secondary outcome scores and 1-year follow-up of a randomised trial of platelet-rich plasma injections in acute hamstring muscle injury: the Dutch Hamstring Injection Therapy study. *British Journal of Sports Medicine*. 2015;49(18):1206-+.
180. Yasui Y, Dankert JF, Tonogai I, Mercer NP, Goodale MB, Fortier LA, et al. The Effect of Single vs Serial Platelet-Rich Plasma Injections in Osteochondral Lesions Treated With Microfracture: An In Vivo Rabbit Model. *American Journal of Sports Medicine*. 2021;49(14):3876-86.
181. Chou S-H, Shih C-L. Efficacy of different platelet-rich plasma injections in the treatment of mild-moderate knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Clinical Practice*. 2021.

182. Van Den Dolder J, Mooren R, Vloon APG, Stoeltinga PJW, Jansen JA. Platelet-rich plasma: Quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Engineering*. 2006;12(11):3067-73.
183. Mosca MJ, Rodeo SA. Platelet-rich plasma for muscle injuries: game over or time out? *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2015;8(2):145-53.
184. Yang J, Zhang X, Chen J, Heng BC, Jiang Y, Hu X, et al. Macrophages promote cartilage regeneration in a time- and phenotype-dependent manner. *Journal of cellular physiology*. 2022.
185. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*. 2014;6:13-.
186. Sanchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Orive G, Padilla S. Muscle repair: platelet-rich plasma derivatives as a bridge from spontaneity to intervention. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2014;45:S7-S14.
187. Sheykhhasan M, Seifalian A, Seifalian A. Plasma-Rich in Growth Factor and its Clinical Application. *Current stem cell research & therapy*. 2021.
188. Delgado D, Bilbao AM, Beitia M, Garate A, Sanchez P, Gonzalez-Burguera I, et al. Effects of Platelet-Rich Plasma on Cellular Populations of the Central Nervous System: The Influence of Donor Age. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(4).
189. Oberlohr V, Lengel H, Hambright WS, Whitney KE, Evans TA, Huard J. Biologics for Skeletal Muscle Healing: The Role of Senescence and Platelet-Based Treatment Modalities. *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2020;28(3).
190. Tidball JG, Flores I, Welc SS, Wehling-Henricks M, Ochi E. Aging of the immune system and impaired muscle regeneration: A failure of immunomodulation of adult myogenesis. *Experimental Gerontology*. 2021;145.
191. Gumpfenberger M, Wessner B, Graf A, Narici MV, Fink C, Braun S, et al. Remodeling the Skeletal Muscle Extracellular Matrix in Older Age-Effects of Acute Exercise Stimuli on Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(19).
192. Henze H, Jung MJ, Ahrens HE, Steiner S, von Maltzahn J. Skeletal muscle aging - Stem cells in the spotlight. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020;189.
193. Netea MG, Quintin J, van der Meer JWM. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe*. 2011;9(5):355-61.
194. Pachito DV, Bagattini AM, de Almeida AM, Mendrone-Junior A, Riera R. Technical Procedures for Preparation and Administration of Platelet-Rich Plasma and Related Products: A Scoping Review. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8.
195. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, et al. Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2012;94A(4):308-16.

196. Garcia TA, Trindade Camargo RC, Koike TE, Tamura Ozaki GA, Castoldi RC, Silva Camargo Filho JC. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2017;21(6):425-33.
197. McClure MJ, Clark NM, Schwartz Z, Boyan BD. Platelet-rich plasma and alignment enhance myogenin via ERK mitogen activated protein kinase signaling. *Biomedical Materials*. 2018;13(5).
198. Jin P, Sejersen T, Ringertz NR. RECOMBINANT PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB STIMULATES GROWTH AND INHIBITS DIFFERENTIATION OF RAT L6 MYOBLASTS. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(2):1245-9.
199. Kelc R, Vogrin M. Concerns about fibrosis development after scaffolded PRP therapy of muscle injuries: Commentary on an article by Sanchez et al.: "Muscle repair: Platelet-rich plasma derivatives as a bridge from spontaneity to intervention." (vol 46, pg 428, 2015). *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2015;46(7):1424-.
200. Qian Y, Han Q, Chen W, Song J, Zhao X, Ouyang Y, et al. Platelet-Rich Plasma Derived Growth Factors Contribute to Stem Cell Differentiation in Musculoskeletal Regeneration. *Frontiers in Chemistry*. 2017;5.
201. Scully D, Naseem KM, Matsakas A. Platelet biology in regenerative medicine of skeletal muscle. *Acta Physiologica*. 2018;223(3).
202. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007;19(6):628-33.
203. Yablonkareuveni Z, Rivera AJ. TEMPORAL EXPRESSION OF REGULATORY AND STRUCTURAL MUSCLE PROTEINS DURING MYOGENESIS OF SATELLITE CELLS ON ISOLATED ADULT-RAT FIBERS. *Developmental Biology*. 1994;164(2):588-603.
204. Wang X, Zhao W, Ransohoff RM, Zhou L. Infiltrating macrophages are broadly activated at the early stage to support acute skeletal muscle injury repair. *Journal of Neuroimmunology*. 2018;317:55-66.
205. Escobar G, Escobar A, Ascui G, Tempio FI, Ortiz MC, Perez CA, et al. Pure platelet-rich plasma and supernatant of calcium-activated P-PRP induce different phenotypes of human macrophages. *Regenerative Medicine*. 2018;13(4):427-41.
206. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology*. 2003;161(6):1163-77.
207. Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, Antoine T, Berkenfeld F, Ferrante F, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nature Cell Biology*. 2017;19(8):915-+.
208. Groppa E, Brkic S, Uccelli A, Wirth G, Korpisalo-Pirinen P, Filippova M, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF. *Embo Reports*. 2018;19(5).

209. Berndt S, Carpentier G, Turzi A, Borlat F, Cuendet M, Modarressi A. Angiogenesis Is Differentially Modulated by Platelet-Derived Products. *Biomedicines*. 2021;9(3).
210. Sanchez M, Garate A, Delgado D, Padilla S. Platelet-rich plasma, an adjuvant biological therapy to assist peripheral nerve repair. *Neural Regeneration Research*. 2017;12(1):47-52.
211. Gigante A, Del Torto M, Manzotti S, Cianforlini M, Busilacchi A, Davidson PA, et al. PLATELET RICH FIBRIN MATRIX EFFECTS ON SKELETAL MUSCLE LESIONS: AN EXPERIMENTAL STUDY. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2012;26(3):475-84.
212. Chellini F, Tani A, Vallone L, Nosi D, Pavan P, Bambi F, et al. Platelet-Rich Plasma Prevents In Vitro Transforming Growth Factor-beta 1-Induced Fibroblast to Myofibroblast Transition: Involvement of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A/VEGF Receptor-1-Mediated Signaling. *Cells*. 2018;7(9).
213. Bubnov R, Yevseenko V, Semeniv I. Ultrasound guided injections of Platelets Rich Plasma for muscle injury in professional athletes. Comparative study. *Medical Ultrasonography*. 2013;15(2):101-5.
214. Hamilton B, Tol JL, Almusa E, Boukarroum S, Eirale C, Farooq A, et al. Platelet-rich plasma does not enhance return to play in hamstring injuries: a randomised controlled trial. *British Journal of Sports Medicine*. 2015;49(14):943-50.
215. Jose Martinez-Zapata M, Orozco L, Balius R, Soler R, Bosch A, Rodas G, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma for the treatment of muscle rupture with haematoma: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Blood Transfusion*. 2016;14(3):245-54.
216. Andres Rossi L, Molina Romoli AR, Bertona Altieri BA, Burgos Flor JA, Edgardo Scordo W, Maria Elizondo C. Does platelet-rich plasma decrease time to return to sports in acute muscle tear? A randomized controlled trial. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*. 2017;25(10):3319-25.
217. Bezuglov E, Maffulli N, Tokareva A, Achkasov E. Platelet-rich plasma in hamstring muscle injuries in professional soccer players. A pilot study. *Mlj-Muscles Ligaments and Tendons Journal*. 2019;9(1):112-8.
218. Hamid MSA, Mohamed MR, Yusof A, George J, Lee LPC. Platelet-Rich Plasma Injections for the Treatment of Hamstring Injuries A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Sports Medicine*. 2014;42(10):2410-8.
219. Hamid MAS, Hussein KH, Helmi Salim AM, Puji A, Mat Yatim R, Yong CC, et al. Study protocol for a double-blind, randomised placebo-controlled trial evaluating clinical effects of platelet-rich plasma injection for acute grade-2 hamstring tear among high performance athletes. *Bmj Open*. 2020;10(8).
220. van der Horst N, van de Hoef S, Reurink G, Huisstede B, Backx F. Return to Play After Hamstring Injuries: A Qualitative Systematic Review of Definitions and Criteria. *Sports Medicine*. 2016;46(6):899-912.

-
221. van der Horst N, Backx FJG, Goedhart EA, Huisstede BMA, Grp HI-D. Return to play after hamstring injuries in football (soccer): a worldwide Delphi procedure regarding definition, medical criteria and decision-making. *British Journal of Sports Medicine*. 2017;51(22):1583-91.
222. Zanon G, Combi F, Combi A, Perticarini L, Sammarchi L, Benazzo F. Platelet-rich plasma in the treatment of acute hamstring injuries in professional football players. *Joints*. 2016;4(1):17-23.
223. Patel A, Chakraverty J, Pollock N, Chakraverty R, Suokas AK, James SL. British athletics muscle injury classification: a reliability study for a new grading system. *Clinical Radiology*. 2015;70(12):1414-20.
224. McNamee MJ, Coveney CM, Faulkner A, Gabe J. Ethics, Evidence Based Sports Medicine, and the Use of Platelet Rich Plasma in the English Premier League. *Health Care Analysis*. 2018;26(4):344-61.
225. Pruna R, Bahdur K, Clos E. The use of platelet rich plasma in the treatment of soft tissue injuries in professional football: a clinical approach through genetics. *Apunts-Medicina De L Esport*. 2019;54(204):109-11.
226. Guyatt GH, Oxman AD, Vist GE, Kunz R, Falck-Ytter Y, Alonso-Coello P, et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *British Medical Journal*. 2008;336(7650):924-6.
227. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;29(1):37-41.
228. Sanchez M. Plasma Rich in Growth Factors to treat Knee Osteoarthritis: Universidad del Pais Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea; 2017.
229. Freire Vallejo V. Derivados hemáticos en la regeneración del epitelio corneal: estudio comparativo in vitro e in vivo: Universidad del Pais Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea; 2016.
230. Terada S, Ota S, Kobayashi M, Kobayashi T, Mifune Y, Takayama K, et al. Use of an Antifibrotic Agent Improves the Effect of Platelet-Rich Plasma on Muscle Healing After Injury. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2013;95A(11):980-8.
231. Padilla S, Sanchez M, Orive G, Anitua E. Towards a correct timing and dosage in PRP applications. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*. 2015;46(8):1697-8.
232. Aguilar CA, Shcherbina A, Ricke DO, Pop R, Carrigan CT, Gifford CA, et al. In vivo Monitoring of Transcriptional Dynamics After Lower-Limb Muscle Injury Enables Quantitative Classification of Healing. *Scientific Reports*. 2015;5.
233. Aguilar CA, Greising SM, Watts A, Goldman SM, Peragallo C, Zook C, et al. Multiscale analysis of a regenerative therapy for treatment of volumetric muscle loss injury. *Cell Death Discovery*. 2018;4.
234. Cezar CA, Arany P, Vermillion SA, Seo BR, Vandeburgh HH, Mooney DJ. Timed Delivery of Therapy Enhances Functional Muscle Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*. 2017;6(19).

235. Williams JR. The declaration of Helsinki and public health. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(8):650-1.
236. Wiesing U, Parsa-Parsi R. The new Declaration of Helsinki, adopted in Fortaleza 2013. *Ethik in Der Medizin*. 2014;26(2):161-6.
237. Cragg WJ, Hurley C, Yorke-Edwards V, Stenning SP. Dynamic methods for ongoing assessment of site-level risk in risk-based monitoring of clinical trials: A scoping review. *Clinical Trials*. 2021.
238. Brukner P. Hamstring injuries: prevention and treatment-an update. *British Journal of Sports Medicine*. 2015;49(19).
239. Brukner P, Connell D. 'Serious thigh muscle strains': beware the intramuscular tendon which plays an important role in difficult hamstring and quadriceps muscle strains. *British Journal of Sports Medicine*. 2016;50(4):205-U91.
240. Flynn D, van Schaik P, van Wersch A. A comparison of multi-item Likert and Visual Analogue Scales for the assessment of transactionally defined coping function. *European Journal of Psychological Assessment*. 2004;20(1):49-58.
241. Binkley JM, Stratford PW, Lott SA, Riddle DL. The lower extremity functional scale (LEFS): Scale development, measurement properties, and clinical application. *Physical Therapy*. 1999;79(4):371-83.
242. Jarvinen TA, Jarvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2013;3(4):337-45.
243. Creighton DW, Shrier I, Shultz R, Meeuwisse WH, Matheson GO. Return-to-Play in Sport: A Decision-based Model. *Clinical Journal of Sport Medicine*. 2010;20(5):379-85.
244. Zambaldi M, Beasley I, Rushton A. Return to play criteria after hamstring muscle injury in professional football: a Delphi consensus study. *British Journal of Sports Medicine*. 2017;51(16):1221-6.
245. Gomez P, de Baranda PS, Ortega E, Contreras O, Olmedilla A. DESIGN AND VALIDATION OF A QUESTIONNAIRE ON THE PER OF THE ATHLETE REGARDING HIS RETURN TO TRAINING AFTER INJURY. *Revista De Psicologia Del Deporte*. 2014;23(2):479-87.
246. Witvrouw E, Danneels L, Asselman P, D'Have T, Cambier D. Muscle flexibility as a risk factor for developing muscle injuries in male professional soccer players - A prospective study. *American Journal of Sports Medicine*. 2003;31(1):41-6.
247. Kelln BM, McKeon PO, Gontkof LM, Hertel J. Hand-held dynamometry: Reliability of lower extremity muscle testing in healthy, physically active, young adults. *Journal of Sport Rehabilitation*. 2008;17(2):160-70.
248. Tol JL, Hamilton B, Eirale C, Muxart P, Jacobsen P, Whiteley R. At return to play following hamstring injury the majority of professional football players have residual isokinetic deficits. *British Journal of Sports Medicine*. 2014;48(18):1364-+.

-
249. Hall MM. Return to Play After Thigh Muscle Injury: Utility of Serial Ultrasound in Guiding Clinical Progression. *Current Sports Medicine Reports*. 2018;17(9):296-301.
250. Hamilton RT, Shultz SJ, Schmitz RJ, Perrin DH. Triple-hop distance as a valid predictor of lower limb strength and power. *Journal of Athletic Training*. 2008;43(2):144-51.
251. Morin J-B, Gimenez P, Edouard P, Arnal P, Jimenez-Reyes P, Samozino P, et al. Sprint Acceleration Mechanics: The Major Role of Hamstrings in Horizontal Force Production. *Frontiers in Physiology*. 2015;6.
252. Krolo A, Gilic B, Foretic N, Pojskic H, Hammami R, Spasic M, et al. Agility Testing in Youth Football (Soccer) Players; Evaluating Reliability, Validity, and Correlates of Newly Developed Testing Protocols. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(1).
253. Fulcher ML, Hanna CM, Elley CR. Reliability of handheld dynamometry in assessment of hip strength in adult male football players. *Journal of Science and Medicine in Sport*. 2010;13(1):80-4.
254. Mentiplay BF, Perraton LG, Bower KJ, Adair B, Pua Y-H, Williams GP, et al. Assessment of Lower Limb Muscle Strength and Power Using Hand-Held and Fixed Dynamometry: A Reliability and Validity Study. *Plos One*. 2015;10(10).
255. Paul DJ, Nassis GP. TESTING STRENGTH AND POWER IN SOCCER PLAYERS: THE APPLICATION OF CONVENTIONAL AND TRADITIONAL METHODS OF ASSESSMENT. *Journal of Strength and Conditioning Research*. 2015;29(6):1748-58.
256. Thorborg K, Petersen J, Magnusson SP, Holmich P. Clinical assessment of hip strength using a hand-held dynamometer is reliable. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2010;20(3):493-501.
257. Tol JL, Hamilton B, Best TM. Palpating muscles, massaging the evidence? An editorial relating to 'Terminology and classification of muscle injuries in sport: The Munich consensus statement'. *British Journal of Sports Medicine*. 2013;47(6):340-1.
258. Gauss-Markov. Gauss-Markov Theorem. *The Concise Encyclopedia of Statistics*: Springer, New York, NY; 2008.
259. Foundation R. The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>: Free Software Foundation's GNU General Public License; 2020.
260. Hebbali A. Olsrr: Tools for Building OLS Regression Models. R package version 0.5.3. ed2020.
261. Akaike H. NEW LOOK AT STATISTICAL-MODEL IDENTIFICATION. *Ieee Transactions on Automatic Control*. 1974;AC19(6):716-23.
262. Hothorn T. Diagnostic Checking in Regression Relationships. *R News* 2002.
263. Pagan. A Simple Test for Heteroscedasticity and Random Coefficient Variation. *Econometrica: Journal of the Econometric Society*. 1979:1287-94.

264. Cárdenas M, Arancibia, H. Potencia estadística y cálculo del tamaño del efecto en G* Power: Complementos a las pruebas de significación estadística y su aplicación en Psicología. *Salud & Sociedad*. 2014(5 (2)):210-24.
265. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. New York: Routledge; 1988.
266. Rendon-Macias ME, Zarco-Villavicencio IS, Villasis-Keever MA. Statistical methods for effect size analysis. *Revista alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico : 1993)*. 2021;68(2):128-36.
267. Cohen J. A power primer. *Psychological Bulletin*. 1992;112:155-9.
268. Hamid AMS, Ali MMR, Yusof A, George J, Lee LP. Platelet-rich plasma injections for the treatment of hamstring injuries: a randomized controlled trial (vol 42, pg 2410, 2014). *American Journal of Sports Medicine*. 2015;43(5):NP13-NP.
269. Chahla J, Cinque ME, Piuzzi NS, Mannava S, Geeslin AG, Murray IR, et al. A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting A Systematic Review of the Clinical Orthopaedic Literature. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*. 2017;99(20):1769-79.
270. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of Autologous Platelet-rich Plasma to Treat Muscle Strain Injuries. *American Journal of Sports Medicine*. 2009;37(6):1135-42.
271. Yin W, Xu Z, Sheng J, Xie X, Zhang C. Erythrocyte sedimentation rate and fibrinogen concentration of whole blood influences the cellular composition of platelet-rich plasma obtained from centrifugation methods. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017;14(3):1909-18.
272. Nguyen HX, Lusic AJ, Tidball JG. Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *Journal of Physiology-London*. 2005;565(2):403-13.
273. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A Special Population of Regulatory T Cells Potentiates Muscle Repair. *Cell*. 2013;155(6):1282-95.
274. Willenborg S, Lucas T, van Loo G, Knipper JA, Krieg T, Haase I, et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*. 2012;120(3):613-25.
275. Boivin J, Tolsma R, Awad P, Kenter K, Li Y. The Biological Use of Platelet-Rich Plasma in Skeletal Muscle Injury and Repair. *American Journal of Sports Medicine*. 2021.
276. Borrione P, Fossati C, Pereira MT, Giannini S, Davico M, Minganti C, et al. The use of platelet-rich plasma (PRP) in the treatment of gastrocnemius strains: a retrospective observational study. *Platelets*. 2018;29(6):596-601.
277. Pollock N, Patel A, Chakraverty J, Suokas A, James SLJ, Chakraverty R. Time to return to full training is delayed and recurrence rate is higher in intratendinous ('c') acute hamstring injury

in elite track and field athletes: clinical application of the British Athletics Muscle Injury Classification. *British Journal of Sports Medicine*. 2016;50(5):305-10.

278. Malliaropoulos N, Isinkaye T, Tsitas K, Maffulli N. Reinjury After Acute Posterior Thigh Muscle Injuries in Elite Track and Field Athletes. *American Journal of Sports Medicine*. 2011;39(2):304-10.

279. Vicens-Bordas J, Esteve E, Fort-Vanmeerhaeghe A, Clausen MB, Bandholm T, Opar D, et al. ECCENTRIC HAMSTRING STRENGTH IS ASSOCIATED WITH AGE AND DURATION OF PREVIOUS SEASON HAMSTRING INJURY IN MALE SOCCER PLAYERS. *International Journal of Sports Physical Therapy*. 2020;15(2):246-53.

280. Opar DA, Williams MD, Shield AJ. Hamstring Strain Injuries Factors that Lead to Injury and Re-Injury. *Sports Medicine*. 2012;42(3):209-26.

281. Fyfe JJ, Opar DA, Williams MD, Shield AJ. The role of neuromuscular inhibition in hamstring strain injury recurrence. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 2013;23(3):523-30.

282. Pieters D, Wezenbeek E, Schuermans J, Witvrouw E. Return to Play After a Hamstring Strain Injury: It is Time to Consider Natural Healing. *Sports Medicine*. 2021.

283. Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, et al. Migratory Chondrogenic Progenitor Cells from Repair Tissue during the Later Stages of Human Osteoarthritis. *Cell Stem Cell*. 2009;4(4):324-35.

284. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, et al. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis and Rheumatism*. 2012;64(11):3626-37.

285. Perdiguero E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Caelles C, Serrano AL, et al. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *Journal of Cell Biology*. 2011;195(2):307-22.

286. Wang H, Melton DW, Porter L, Sarwar ZU, McManus LM, Shireman PK. Altered Macrophage Phenotype Transition Impairs Skeletal Muscle Regeneration. *American Journal of Pathology*. 2014;184(4):1167-84.

287. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2010;298(5):R1173-R87.

288. Smythe GM, Shavlakadze T, Roberts P, Davies MJ, McGeachie JK, Grounds MD. Age influences the early events of skeletal muscle regeneration: Studies of whole muscle grafts transplanted between young (8 weeks) and old (13-21 months) mice. *Experimental Gerontology*. 2008;43(6):550-62.

289. McGeachie JK, Grounds MD. RETARDED MYOGENIC CELL REPLICATION IN REGENERATING SKELETAL-MUSCLES OF OLD MICE - AN AUTORADIOGRAPHIC STUDY IN YOUNG AND OLD BALBC AND SJL/J MICE. *Cell and Tissue Research*. 1995;280(2):277-82.

290. Weavers H, Evans IR, Martin P, Wood W. Corpse Engulfment Generates a Molecular Memory that Primes the Macrophage Inflammatory Response. *Cell*. 2016;165(7):1658-71.

291. Hashimoto Y, Tabuchi Y, Sakurai K, Kutsuna M, Kurokawa K, Awasaki T, et al. Identification of Lipoteichoic Acid as a Ligand for Draper in the Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* Hemocytes. *Journal of Immunology*. 2009;183(11):7451-60.
292. Pollock N, Kelly S, Lee J, Stone B, Giakoumis M, Polglass G, et al. A 4-year study of hamstring injury outcomes in elite track and field using the British Athletics rehabilitation approach. *British journal of sports medicine*. 2021.

8 ANEXOS