



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevas aproximaciones terapéuticas para la regeneración muscular basadas en el ejercicio físico, plasma rico en plaquetas (PRP) y glicosaminoglicanos en modelo de rata

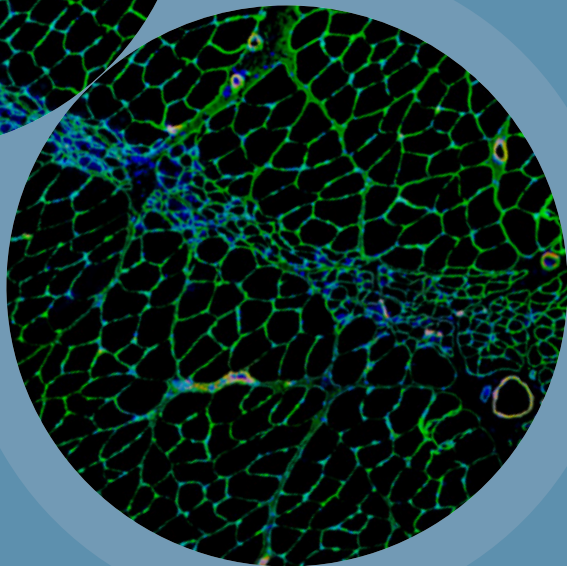
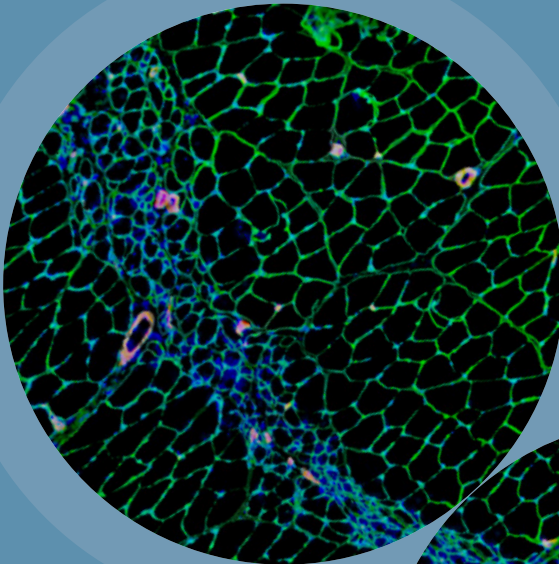
Paola Contreras Muñoz

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Nuevas aproximaciones terapéuticas para la regeneración muscular basadas en el ejercicio físico, plasma rico en plaquetas (PRP) y glicosaminoglicanos en modelo de rata



Paola Contreras Muñoz
Barcelona 2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L' ALIMENTACIÓ

Memoria presentada por **Paola Contreras Muñoz**, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona, por el programa de Doctorado en Biomedicina.

La presente tesis doctoral, **“Nuevas aproximaciones terapéuticas para la regeneración muscular basadas en el ejercicio físico, plasma rico en plaquetas (PRP) y glicosaminoglicanos en modelo de rata”** ha sido realizada en el grupo Bioingeniería, Terapia Celular y Cirugía en Malformaciones Congénitas bajo la codirección del Dr. Mario Marotta Baleriola y el Dr. Gil Rodas Font y tutorización del Dr. Pedro Marrero González

Mario Marotta Baleriola

Gil Rodas Font

Pedro Marrero González

Paola Contreras Muñoz

Barcelona

Mayo, 2017

Ever tried. Ever failed.

No matter. Try again.

Fail again. Fail better.

SAMUEL BECKETT

Así creo que es la vida.

No un dogma, no un código. No una historia, sino un misterio al que hay que atacar por distintos flancos.

No con el fin de desentrañarlo (lo cual sería horrible) sino con el fin de no darnos jamás por derrotados.

REINALDO ARENAS

Agradecimientos

Cuando me preguntaron a los ocho años, ¿qué vas a ser de mayor?, lo tuve claro. Sería bióloga marina y viviría en el barco de Jacques Cousteau, estudiando e investigando la vida submarina. Lejos de cumplirse mi vaticinio, no deja de sorprenderme cómo desde niños ya conocemos qué levantará nuestras pasiones en la vida adulta y no hay duda que la ciencia es una de las mías.

Quiero agradecer a Mario, mi director de tesis, la confianza que puso en mí aquella mañana en la que me ofreció unirme a su equipo. Aquel día y todos los que le siguieron desde entonces, porque más que un jefe es un amigo y porque consigue mantener el equilibrio perfecto, motivándote para que des lo mejor de ti. Gracias por enseñarme los entresijos de una profesión que más que eso, es una opción de vida.

A Gil, por su dirección en mi tesis doctoral, ha sido todo un orgullo trabajar a tu lado. Gracias por tus ideas, tu cercanía y la ilusión con la que comenzamos cada proyecto.

Quiero agradecer a la empresa Bioiberica S.A. y en especial a la Fundación Leitat, por su apoyo y confianza. Estos resultados no serían posibles sin su participación.

A Ramón Torrella; melómano, *austeriano* y amigo. Gracias por tu constante disponibilidad y por toda la ayuda que me has brindado durante esta tesis doctoral. Por tus inolvidables anécdotas y por tu sentido del humor, incluso cuando la vida nos ponía a prueba en nuestros maratones *ratiles*.

A las chicas del laboratorio, a las que se fueron (Marta Vila, Carla, Marina y Laura) y a las que siguen a mi lado (Marta Ribases, Maite, Iris y Bárbara) y muy en especial a Alex y a mis creativas Cris y Anna. Porque uno cree que ya ha conocido a todos sus amigos, y a veces se equivoca. Gracias por las incontables risas, por vuestro apoyo y por tantos y tanto recuerdos.

A mis amigos, (ya sabéis quiénes sois), en especial a los que han vivido aquí estos años. Por ser mi familia, por todo lo construido y porque «nuestra amistad fue de ésas que una vez que se establece ya es para siempre; como el encuentro de un ser querido al que siempre hubiésemos estado añorando y que, súbitamente, hubiera hecho su aparición» R.A.

A Celia, por ser y por estar siempre, porque no sería quien soy sin ti y porque nunca dudaste, jamás, incluso cuando yo lo hacía. No te agradezco esta tesis, te agradezco una vida.

A mi abuelo Manolo, es un orgullo para mí haber sido la primera de tres generaciones en conseguir vuestro sueño, la ciencia se perdió a un gran científico. De ti admiro casi todo; gracias por tu paciencia, por los valores que difundes, por tu serenidad y por tu inteligencia.

A mi hermana pequeña, ni todos mis esfuerzos por asustarte y hacer que bebieras agua de la bañera han podido palidecer la maravillosa persona en la que te has convertido. Gracias por poner también tu granito de arena en esta tesis y dejar en su portada un pedacito de tu asombrosa creatividad.

A Mirto; amigo peludo, cariñoso y peleón. Porque ha vivido la gesta de estas páginas como nadie y porque *cuando quiere* hace que te olvides de todos tus problemas.

A Pablo, por ser mi familia, mi compañero, mi mejor amigo y por ser TODO. Por tu apoyo incondicional siempre, porque *#situnoyono* y porque «traes la alegría irracional de un gol en tiempo de descuento» M.

A mis padres, por enseñarme todo lo que sé, por darme las mejores herramientas con las que librar batallas y porque sois un ejemplo de resiliencia, de valentía, de alegría y de amor.

Quiero acabar estos agradecimientos, citando unas palabras de Marie Curie, porque tal y como dijo en la conferencia «El porvenir de la cultura», que impartió en su viaje a España en 1933; en la carrera de la ciencia, la principal motivación ha sido la indescriptible emoción ante un nuevo descubrimiento:

«Estoy entre los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño frente a los fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas. No debemos permitir que se crea que todo el proceso científico se puede reducir a mecanismos, máquinas, motores; aunque toda esa maquinaria tiene también su propia belleza.

No creo que el espíritu de aventura corra ningún riesgo de desaparecer en nuestro mundo. Si veo alrededor de mí algo especialmente vivo es precisamente ese espíritu de aventura, que parece indestructible y está emparentado con la curiosidad».

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
1. Introducción general.....	3
1.1. Músculo esquelético.....	5
1.1.1. Miogénesis embrionaria. Origen y formación.....	5
1.1.2. Estructura.....	8
1.1.2.1. Matriz extracelular.....	12
1.1.3. Función.....	14
1.1.3.1. Tipos de fibra muscular.....	15
1.2. Regeneración del músculo esquelético.....	17
1.2.1. Fase degenerativa.....	18
1.2.1.1. Necrosis de las miofibras.....	18
1.2.1.2. Inflamación.....	19
1.2.2. Fase de reparación.....	21
1.2.2.1. Células Satélite.....	21
1.2.3. Fase de remodelación.....	23
1.2.3.1. Vascularización, inervación y carga mecánica.....	24
1.2.4. Regulación de la regeneración muscular.....	25
1.2.4.1. HGF.....	26
1.2.4.2. IGFs.....	26
1.2.4.3. Familia TGF.....	26
1.2.4.4. FGFs.....	27
1.2.4.5. Familia de Citoquinas IL6	27
1.2.4.6. TNF- α	27
1.3. Deporte y músculo esquelético.....	28
1.4. Lesiones deportivas musculares humanas.....	31
1.4.1. Tipos de lesiones.....	31
1.4.2. Clasificación.....	32
1.4.3. Herramientas de diagnóstico.....	34
1.5. Práctica clínica en lesiones musculares humanas y alternativas terapéuticas.....	35
1.5.1. Terapias alternativas.....	37

1.5.1.1. Tratamiento farmacológico.....	37
1.5.1.2. Terapia por ultrasonido.....	37
1.5.1.3. Oxigenoterapia hiperbárica.....	38
1.5.2. Rehabilitación activa temprana como herramienta terapéutica.....	38
1.6. Estudio de nuevas terapias en modelos pre-clínicos que imitan la patología deportiva.....	40
1.6.1. Modelos animales de lesiones musculares.....	41
1.6.2. Terapia con factores de crecimiento.....	42
1.6.2.1. PRP.....	43
1.6.3. Terapia con Glicosaminoglicanos.....	50
2. Objetivos.....	53
3. Informe del director.....	57
4. Publicaciones.....	61
4.1. Artículo I.....	63
4.2. Artículo II.....	73
4.3. Artículo III.....	87
5. Resumen global de los resultados.....	119
6. Discusión.....	125
6.1. Lesiones deportivas en el músculo esquelético y problemática.....	127
6.2. Desarrollo de un nuevo modelo pre-clínico de lesión muscular.....	129
6.2.1. Caracterización del nuevo modelo experimental de lesión muscular en rata.....	131
6.2.1.1. Evaluación histopatológica.....	131
6.2.1.2. Estudio funcional mediante la evaluación de fuerza muscular.....	133
6.2.1.3. Caracterización de la lesión muscular mediante técnicas de imagen: RM.....	134
6.3. Terapias biológicas en la medicina regenerativa aplicadas al deporte.....	135
6.3.1. Efectos de la terapia con PRP y Rehabilitación activa temprana.....	136
6.3.1.1. Estudio funcional de recuperación de fuerza muscular.....	138

6.3.1.2. Evaluación histológica del efecto terapéutico de los tratamientos.....	139
6.3.1.3. Correlación de los resultados en el modelo animal con estudios en clínica humana.....	142
6.3.2. Efectos terapéuticos del tratamiento de lesión muscular con GAG.....	143
6.3.2.1. Estudio funcional de recuperación de fuerza muscular.....	144
6.3.2.2. Evaluación histológica del efecto terapéutico de los tratamientos.....	145
7. Conclusiones.....	149
8. Bibliografía.....	153

Abreviaturas

AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
CS	Condroitín sulfato
CSA	Área de la sección transversal (<i>Cross-Sectional Area</i>)
dMHC	Miosina del desarrollo de cadena pesada (<i>Developmental Myosin Heavy Chain</i>)
DOMS	Dolor muscular de aparición tardía (<i>Delayed Onset Muscle Soreness</i>)
ECM	Matriz extracelular (<i>Extracellular Matrix</i>)
FGFs	Factor de crecimiento de fibroblastos (<i>Fibroblast Growth Factors</i>)
GAG	Glicosaminoglicanos
GLU	Glucosamina
HBP	Proteínas de unión a la heparina (<i>Heparin binding proteins</i>)
H-E	Hematoxilina y Eosina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)
HIF-1 α	Factor1 inducible por hipoxia (<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>)
HSPG	PGs de heparán sulfato
IGFs	Factores de crecimiento insulínico (<i>Insulin-like Growth Factors</i>)
IL-1 β	Interleuquina 1 beta (<i>Interleukin 1 beta</i>)
IL-6	Miembros de la familia de citoquinas interleuquinas-6 (<i>Interleukin 6</i>)

LIF	Factor inhibidor de leucemia (<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>)
MGF	Factor de crecimiento mecánico (<i>Mechano Growth Factor</i>)
MPC	Células precursoras miogénicas (<i>Myogenic Precursor Cells</i>)
MRF	Factores de transcripción específicos de músculo (<i>Muscle Regulatory Factors</i>)
MTJ	Uniones miotendinosas (<i>Myotendinous Junction</i>)
Myf-4/ MyoG	Miogenina
OA	Osteoartritis
OHB	Oxigenoterapia hiperbárica
PDGF	Factores de crecimiento derivados de plaquetas (<i>Platelet-Derived Growth Factors</i>)
PGs	Proteoglicanos
PPP	Plasma pobre en plaquetas (<i>Platelet-Poor Plasma</i>)
PRP	Plasma rico en plaquetas
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SYSADOA	Fármacos de acción sintomática lenta para la osteoartritis (<i>Slow Actin Drugs for Osteoarthritis</i>)
TetF	Fuerza tetánica (<i>Tetanus force</i>)
TGF- β	Miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming Growth Factors beta</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Músculo esquelético

El músculo esquelético constituye cerca del 40% de la masa corporal total siendo, por tanto, el tejido más abundante del cuerpo humano (Huard et al. 2002a); es altamente dinámico, adaptable y cambia constantemente en respuesta a señales fisiológicas como la demanda metabólica o biomecánica. Está compuesto por fibras musculares, una red organizada de nervios y vasos sanguíneos y una matriz extracelular de tejido conjuntivo (Garrett WE Jr 1994). Las fibras musculares a través de la estimulación de los nervios, son responsables de la función contráctil del músculo, mientras que el tejido conjuntivo une a las células musculares durante la contracción muscular y constituye el soporte de los vasos sanguíneos y nervios necesarios para el mantenimiento del músculo y su actividad. Esta disposición es necesaria para mantener la estructura corporal, crear el movimiento articular y la locomoción, así como para apoyar el proceso de regeneración que se produce después de una lesión muscular.

1.1.1. Miogénesis embrionaria. Origen y formación

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, se establecen las tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo, a través de un proceso llamado gastrulación. El mesodermo forma los huesos, los cartílagos, el tejido conjuntivo y los músculos del tronco del cuerpo. A ambos lados del tubo neural, el mesodermo se divide en axial (notocorda), intermedio, paraxial y lateral (Christ & Ordahl 1995). Con la excepción de los músculos craneofaciales, casi todos los músculos esqueléticos embrionarios derivan del mesodermo paraxial.

En primer lugar, el mesodermo paraxial se separa en grupos celulares, llamados somitas, comenzando en la región de la cabeza. Las células de la parte ventral de estos somitas embrionarios, experimentan una transición de epitelial a mesenquimal, formando así el esclerótomo, que dará lugar a la formación de las vértebras y las costillas. Este proceso se caracteriza por la expresión de dos miembros de la familia de los factores de transcripción Pax (*Paired box*), Pax3 y Pax7, los cuales desempeñan un papel esencial en la organogénesis embrionaria

(Tremblay & Gruss 1994). Las células de la parte dorsal de los somitas forman el dermomiótoma, responsable de la musculatura y de la dermis, que se divide en una parte epiaxial e hipoaaxial formando los músculos profundos de la espalda, los intercostales, abdominales y los pertenecientes a las extremidades (Christ & Ordahl 1995; Buckingham et al. 2003) (Figura 1).

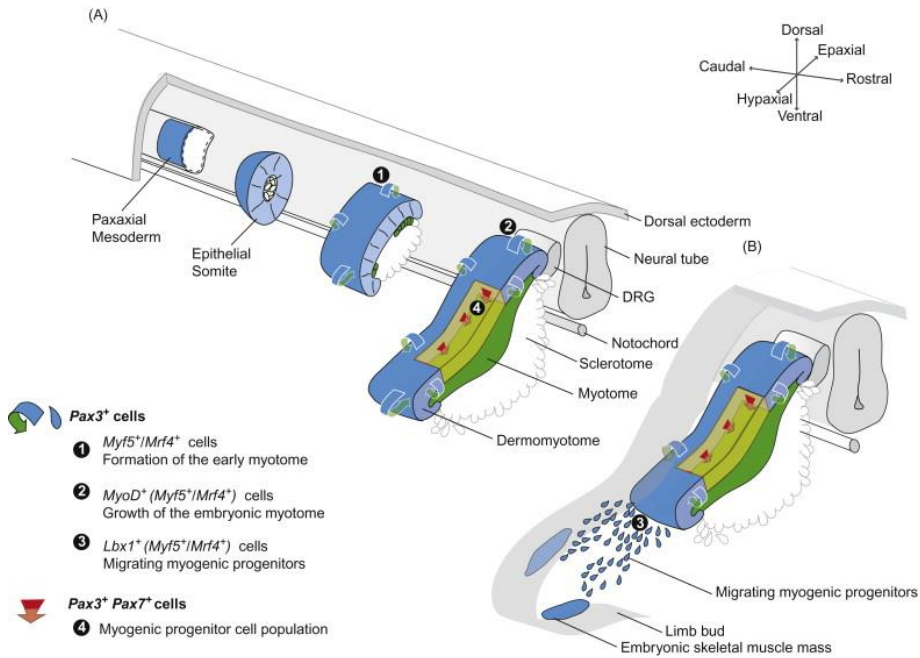


Figura 1. Representación esquemática de la somitogénesis. *Figura extraída de (Buckingham et al 2003).*

Uno de los pasos más cruciales en la formación del músculo esquelético, es la aparición del miótoma. Dado que el dermomiótoma desaparece progresivamente (Christ & Ordahl 1995) y el miótoma ya es post-mitótico, estas estructuras solas no podrían explicar el desarrollo muscular que se genera posteriormente en todo el embrión. Por ello, es vital la contribución de las células precursoras miogénicas (*Myogenic Precursor Cells*, MPC) al crecimiento muscular (Relaix et al. 2005); éstas se distribuyen por los cuatro bordes del dermomiótoma (Gros et al. 2004), expresan

secuencialmente Pax3 y Pax7 y migran desde el dermomiótoma central hacia el miótoma, quedando contenidas dentro de la masa muscular (Figura 1).

El proceso de formación del músculo esquelético recibe el nombre de miogénesis. La especificación de las MPC al linaje miogénico está regulada por señales tanto positivas como negativas de los propios tejidos circundantes. Las proteínas de señalización *Sonic hedgehog* (Shh) y *Wingless* (Wnt), implicadas en el desarrollo muscular, son liberadas por el tubo neural, la notocorda y el ectodermo superficial proporcionando señales de estimulación durante la formación del músculo esquelético. Por el contrario, las proteínas morfogénicas óseas (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs), se liberan desde el tubo neural y la placa lateral del mesodermo para inhibir dicho proceso (Cossu et al. 1996; Chargé & Rudnicki 2004) (Figura 2A).

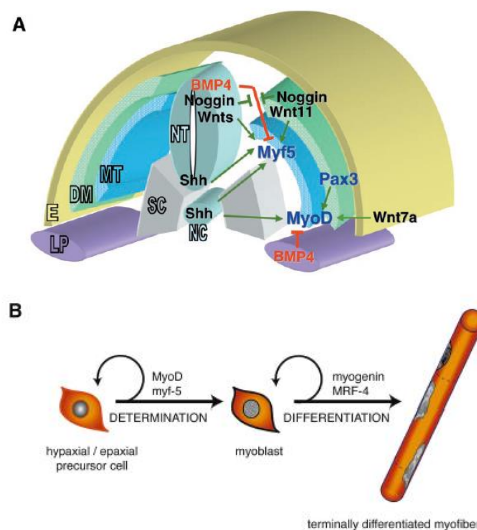


Figura 2. Factores de señalización y marcadores celulares involucrados en la formación del músculo esquelético embrionario. A: Las células somáticas mesodérmicas localizadas en la parte dorsal del somita [dermomiótoma (DM)], reciben señales de los tejidos circundantes, induciendo [Wnts, *Sonic hedgehog* (Shh), *Noggin*] o inhibiendo (BMP4) la expresión de los MRF primarios (Myf5 y MyoD). MT, miótoma; E, ectodermo; LP, placa lateral; SC, esclerótomo; NC, notocorda; NT, tubo neural. B: La expresión de MyoD y Myf 5 está implicada en la determinación del destino miogénico de las células precursoras, mientras que la Miogenina y la expresión de MRF4 se asocian con diferenciación terminal. *Figura adaptada de (Chargé & Rudnicki 2004 y Hawke & Garry 2001).*

La miogénesis está regulada por una combinación de factores de transcripción específicos de músculo (*Muscle Regulatory Factors* o MRF) (Rudnicki et al. 1993; Kassar-Duchossoy et al. 2004) y otros factores como los llamados *Myocyte Enhancer Factor* (MEF) (Gossett et al. 1989) y miembros de la familia E2A (Berkes & Tapscott 2005). Los MRF, pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción con un dominio básico tipo *helix-loop-helix* y se componen por MyoD (Rudnicki et al. 1993), Myf-5 (Rudnicki et al. 1993; Braun et al. 1989), Miogenina (Myf-4/ MyoG) (Wright et al. 1989) y MRF4 (Myf-6/Herculin) (Rhodes & Konieczny 1989). Myf5 es el primer MRF que se expresa durante el desarrollo embrionario del músculo, lo hace de forma transitoria e induce la expresión inicial de MyoD, considerado el primer gen que determina el linaje mioblástico de las células. Las MPC positivas en MyoD y/o Myf5 se denominan mioblastos, los cuales pasan a expresar de manera secuencial los MRF, MyoG y MRF4 (Tajbakhsh & Buckingham 2000)(Figura 2B) como paso previo a la fusión y posterior formación de un sincitio multinucleado (miocito ó miotubo), que madura hasta formar las fibras musculares. Durante el curso del desarrollo muscular, una subpoblación distinta de mioblastos permanece asociada a la superficie de la miofibra en desarrollo sin diferenciarse, como células satélites (*Satellite Cells*, SC) musculares quiescentes (Relaix et al. 2005; Gros et al. 2005). Tras la madurez sexual, el músculo esquelético se constituye como un tejido estable compuesto por fibras musculares post-mitóticas multinucleadas (Schmalbruch & Lewis 2000).

1.1.2. Estructura

El elemento básico del músculo esquelético es la fibra muscular o miofibra, generada a partir de la fusión múltiple de mioblastos, que da lugar a un sincitio multinucleado envuelto en una membrana celular llamada sarcolema. Ésta se encuentra rodeada de la membrana basal, una delgada red de proteínas entre las que destacan el colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato, fibronectina y laminina; y que se divide en una lámina basal y una capa de fibras reticulares (Garrett WE Jr 1994).

Las fibras musculares están unidas entre sí por una estructura de tejido conjuntivo compuesta por 3 niveles de organización, denominados endomisio, perimisio y epimisio (Takala & Virtanen 2000; Gillies & Lieber 2011) (Figura 3). El componente

básico de esta estructura es el endomisio, una delgada capa de tejido conjuntivo que rodea a cada miofibra de manera individual. Las fibras musculares se organizan a su vez en fascículos (pudiendo englobar desde algunas decenas a un par de cientos de fibras musculares) y están rodeados de una capa de tejido conjuntivo llamado perimisio. El último nivel es el epimisio, una capa externa de tejido conjuntivo más resistente y de mayor grosor, que rodea por completo al músculo esquelético.

El colágeno es la proteína estructural predominante en la ECM del músculo esquelético. Los tipos I, III, IV, V, VI, XI, XII, XIV, XV, y XVIII se expresan durante el desarrollo del músculo esquelético (Halfter et al. 1998; Listrat et al. 2000; Marvulli et al. 1996; Myers et al. 1996; Nishimura et al. 1997), aunque son los tipos I y III los que predominan en el endo-, peri- y epimisio adulto. Sin embargo, el colágeno tipo I es algo más abundante en el perimisio y tanto en el endomisio como en el epimisio, la composición del colágeno tipo I y III se distribuye a partes iguales (Light & Champion 1984). La red de tejido conjuntivo, a su vez, crea un esqueleto de apoyo para las miofibras, agrupando la contracción de las fibras individuales en un esfuerzo conjunto, convirtiendo así, su contracción individual en una locomoción eficiente.

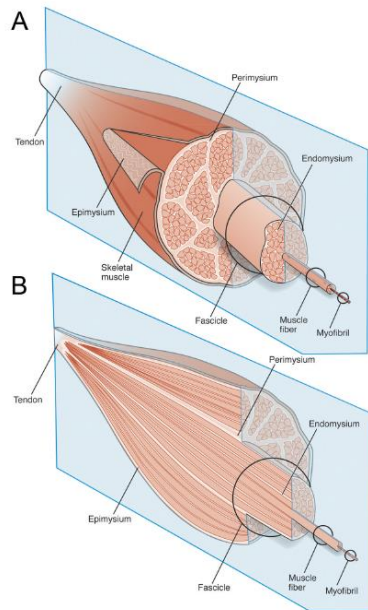


Figura 3. Diagrama esquemático del sistema de organización del tejido muscular y de la MTJ. **A:** La ECM muscular puede clasificarse como epimisio (rodeando al músculo), perimisio (rodeando los fascículos musculares) y endomisio (rodeando las fibras musculares). **B:** Sección transversal del tejido muscular indicando que el perimisio puede continuar hasta el tendón, mientras que el endomisio está limitado a los fascículos musculares. *Figura extraída de (Gillies & Lieber 2011).*

El citoplasma de la miofibras o sarcoplasma está mayoritariamente formado por miofilamentos denominados miofibrillas. Cada miofibrilla, observada por microscopía, contiene segmentos alternantes, bandas claras, llamadas Bandas I (isótropas, que no dejan pasar la luz uniformemente y están compuestas por filamentos de actina), y bandas oscuras, denominadas Bandas A (anisótropas, que por el contrario no dejan pasar la luz y están compuestas por filamentos de actina y miosina). Dispuestas en perpendicular al eje longitudinal de la célula, se encuentra la línea Z, que divide la banda I en dos porciones iguales. El segmento que engloba dos líneas Z consecutivas, se denomina sarcómero y constituye la unidad fisiológica elemental de la contracción muscular (Hanson & Huxley 1953) (Figura 4).

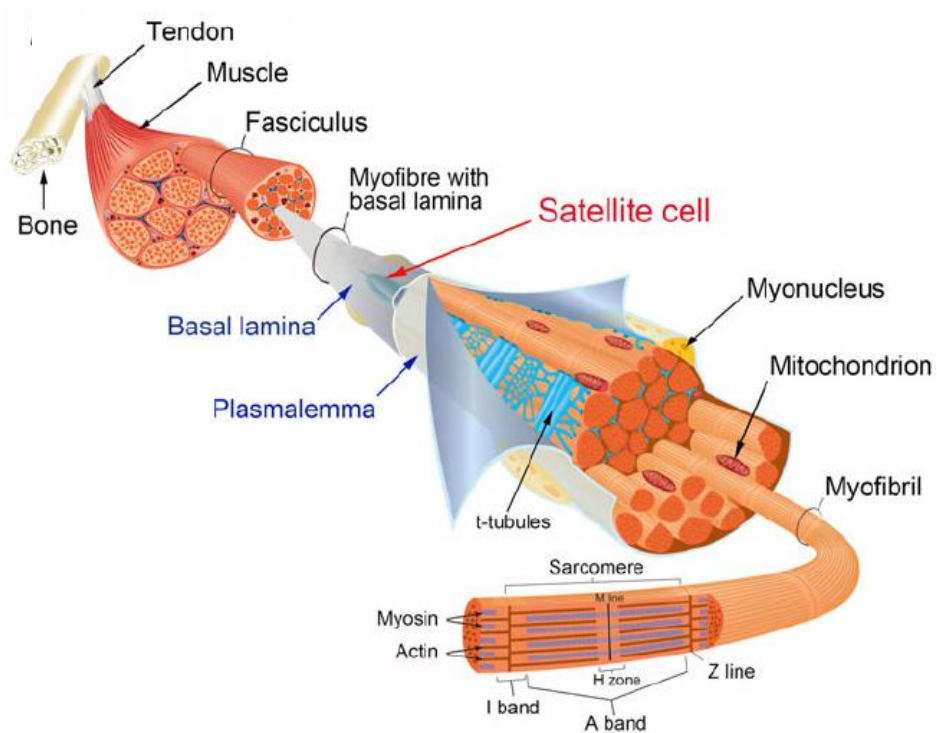


Figura 4. Estructura y ultra-estructura del músculo esquelético. *Figura extraída de (Relaix & Zammit 2012).*

Cada miofibrilla está conectada por ambos extremos al tejido conjuntivo, ya sea a la fascia o a un tendón en las denominadas uniones miotendinosas (*Myotendinous Junction*, MTJ) (Tidball & Daniel 1986). Esta unión posee la fuerza suficiente como para soportar una tensión de hasta 1000 kg durante una carga de trabajo (Tidball 1991). Esta fuerza de tan alta resistencia es posible gracias al complejo de distrofina-glicoproteínas (Michele & Campbell 2003) y a unas glicoproteínas llamadas integrinas (Mayer 2003), que conectan el aparato contráctil de los miofilamentos con la matriz extracelular (*Extracellular Matrix*, ECM) a través del sarcolema (Sunada & Campbell 1995).

1.1.2.1. Matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM) está constituida por un conjunto de proteínas y polisacáridos que forman una malla organizada que actúa de soporte para las células y se adapta a sus requisitos funcionales.

Durante años se ha considerado que la única función de la ECM era mecánica, de soporte y estabilización física de los tejidos. En cambio, actualmente se conoce que la ECM también interviene en el comportamiento de las células que sustenta, proporcionando señales de supervivencia, proliferación, migración y diferenciación (Gillies & Lieber 2011). Así mismo, modula la producción, la degradación y la remodelación de sus componentes para apoyar el desarrollo y la reparación de tejidos (Lu et al. 2011).

La ECM se compone de dos clases principales de macromoléculas: proteoglicanos (PGs) y proteínas fibrosas (Järveläinen et al. 2009; Schaefer & Schaefer 2010). Las principales proteínas fibrosas de la ECM son el colágeno, la elastina, la fibronectina y la laminina (Alberts et al. 2007). Los PGs son proteínas glicosiladas con una alta carga neta negativa que están implicadas en diversos procesos biológicos, modulando la actividad de los factores de crecimiento, organizando el ambiente extracelular y manteniendo la estructura y función del tejido. Están formadas por un núcleo proteico que se encuentra unido covalentemente a un tipo especial de polisacáridos denominados glicosaminoglicanos (GAG) (Hardingham & Fosang 1992). Los PGs pueden estar compuestos por cuatro tipos de GAG: heparán sulfato (HS), condroitín sulfato (CS), dermatán sulfato (DS) y queratán sulfato (QS) (Tabla 1); siendo los más abundantes en el músculo esquelético los que contienen CS y DS, como la decorina y el biglicano (Brandan & Inestrosa 1987). Según su localización, los PGs además, se pueden dividir en tres grupos: PGs extracelulares, PGs intracelulares y PGs asociados a membranas (Tabla 1).

Se ha descrito que los PGs pueden unirse a factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factors*, FGFs), el factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF) o a miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF- β). Estos factores pueden ser liberados y activados por proteasas

extracelulares, permitiendo su unión a receptores de membrana de las SC y las miofibras, activando vías de señalización intracelular (Whitelock et al. 1996).

(a) According to the glycosaminoglycan attached:

Chondroitin sulfate

Aggrecan	Cartilage
Betaglycan	Fibroblasts
Biglycan	Muscle
Decorin	Connective tissue
Perlecan	Basement membrane
Serglycin	Mast cells, hematopoietic cells
Syndecan 1, 3	Epithelial cells, fibroblasts
Versican	Blood vessels, skin

Dermatan sulfate

Biglycan	Muscle
Decorin	Connective tissue

Heparan sulfate

Agrin	Basement membrane
Betaglycan	Fibroblasts
CD44 V3	Keratinocytes, activated monocytes
Collagen XVIII	Epithelial cells, basement membrane
Glypican 1-6	Epithelial cells, fibroblasts
Perlecan	Basement membrane
Serglycin	Mast cells, hematopoietic cells
Syndecan 1-4	Epithelial cells, fibroblasts

Keratan sulfate

Aggrecan	Cartilage
Fibromodulin	Extracellular matrix
Lumican	Corneal stroma

(b) According to cell localization:

Extracellular

Aggrecan	Cartilage
Agrin	Basement membrane
Biglycan	Muscle
Collagen XVIII	Epithelial cells, basement membrane
Decorin	Connective tissue
Fibromodulin	Extracellular matrix
Lumican	Corneal stroma
Perlecan	Basement membrane
Versican	Blood vessels, skin

Membrane-associated

Betaglycan	Fibroblasts
CD44v3	Lymphocytes
Glypican 1-6	Epithelial cells, fibroblasts
Neuropilin-1	Endothelial cells
Syndecan 1-4	Epithelial cells, fibroblasts

Intracellular

Serglycin	Mast cells, hematopoietic cells
-----------	---------------------------------

Tabla 1. Clasificación de los PGs. *Tabla extraída de (White & Smythe 2016).*

1.1.3. Función

Las fibras musculares esqueléticas están inervadas por fibras nerviosas mielínicas cuyo cuerpo celular son las neuronas motoras o motoneuronas. Son las emisoras del impulso nervioso que causa la contracción de la fibra muscular y pueden provenir del asta anterior de la médula espinal o de los núcleos motores del tronco encefálico. La conexión o sinapsis entre la placa motora (zona de agregación de receptores de acetilcolina en el sarcolema muscular) y un axón de una neurona motora, se llama unión neuromuscular (*Neuromuscular Junction*, NMJ); ésta, contiene tres componentes estructurales principales: el axón presináptico, la hendidura sináptica, y el área postsináptica de las miofibras.

La neurona motora y el conjunto de miofibras a las que estimula constituyen una unidad motora. El número de miofibras dentro de una unidad motora y el número de unidades motoras por músculo esquelético varían según el tipo de movimiento realizado por el músculo y su función (Huard et al. 2002a).

El paso inicial en la contracción muscular implica la liberación de acetilcolina por los axones presinápticos en las hendiduras sinápticas. La acetilcolina liberada en la hendidura sináptica se une a los receptores de la acetilcolina de los pliegues postsinápticos de las miofibras (área postsináptica) y consecuentemente despolariza la célula. La despolarización provoca un potencial de acción que pasa a lo largo de las miofibras, desencadenando la contracción muscular. Después de la despolarización del terminal axónico de la placa motora, el impulso eléctrico pasa a lo largo de la membrana muscular hasta alcanzar el interior del músculo por medio del túbulo transversal. Esto provoca una liberación momentánea de calcio en el retículo sarcoplásmico (Garrett WE Jr 1994). El calcio que se libera se une a la troponina, que es un componente de los filamentos de actina a la que se une la miosina, provocando un cambio conformacional de ésta. Esto permite la interacción entre la actina y la miosina, produciendo un mecanismo de deslizamiento de unas sobre otras, generando el mecanismo básico de contracción muscular (Huxley 2000). Al finalizar la contracción muscular, la acetilcolina es desactivada por la enzima acetilcolinesterasa (o por otras colinesterasas menos específicas), el músculo

se relaja, el calcio intracelular es devuelto al exterior del sarcolema y la troponina impide la interacción entre las moléculas de actina y miosina (Garrett WE Jr 1994).

1.1.3.1. Tipos de fibra muscular

Las fibras musculares de mamíferos adultos son muy heterogéneas, hecho que le confiere al músculo una gran plasticidad en cuanto a intensidad y durabilidad de la contracción muscular. Existe cuatro tipos de fibras que se clasifican en función de la velocidad de contracción, la resistencia a la fatiga, el metabolismo y el tipo de cadena pesada de la miosina (*Myosin Heavy Chain*, MHC) que expresan (Schiaffino 2010). Así, las fibras de contracción lenta (o rojas) se denominan de tipo 1, y las de contracción rápida (o blancas) que son denominadas de tipo 2, se subdividen a su vez en las isoformas de tipo IIa (intermedia), tipo IIx (rápida) y tipo IIb. A pesar de que el gen del tipo IIb existe en el genoma humano, su correspondiente miosina de cadena pesada no se expresa en los principales músculos humanos (Smerdu et al. 1994). En la Tabla 2 se resumen las características funcionales más importantes de los diferentes tipos de fibras musculares.

Existen diferentes tipos de unidades motoras, éstas se clasifican en función de la α -motoneurona y la fibra muscular a la que está unida (Garrett WE Jr 1994; Wackerhage 2014): Tipo S (Tiempo de contracción lento, nivel de fuerza bajo, resistente a la fatiga, inervan fibras de tipo I), Tipo FR (Tiempo de contracción rápido, nivel de fuerza media, resistente a la fatiga, inervan fibras de tipo IIa) y Tipo FF (Tiempo de contracción rápido, nivel de fuerza alto, fatigables, inervan fibras de tipo IIb/IIx).

La fuerza ejercida por un músculo, depende del número de unidades motoras activadas y la frecuencia de sus potenciales de acción (Harrison & Johannisson 1983). Las unidades motoras se activan en una secuencia preestablecida (S-FR-FF), llamada reclutamiento ordenado, que está determinada principalmente por el tamaño de la motoneurona (Henneman 1957; Gustafsson & Pinter 1985); ésta indica que el reclutamiento se basa en la fuerza requerida, no en la velocidad de movimiento. Por lo tanto, las unidades motoras lentas siempre se activan independientemente de la velocidad.

Por último, si además nos basamos en las capacidades anaeróbica/aeróbica, las unidades motoras se pueden clasificar de manera alternativa como oxidativas de contracción lenta (SO), oxidativas glicolíticas de contracción rápida (FOG) y glicolíticas de contracción rápida (FG) (Brooke & Kaiser 1974).

FIBRE TYPE (MAJOR MYOSINE HEAVY CHAIN EXPRESSED)	TYPE I	TYPE IIA	TYPE IIX/IIB*
Description	Slow, red, fatigue resistant	Intermediate, red, fatigue resistant	Fast, white, readily fatigued
Nuclei per mm of fibre (Tseng et al.,1994)	High	Medium?	Low
Maximal shortening speed when fully Ca ²⁺ activated	Slow	Fast	Slightly faster still
Force build up and force relaxation before and after twitches and isometric contractions	Slow	Medium	Fast
ATPase activity under “physiological” conditions, fully Ca ²⁺ activated	Low	Medium	High
Glycolytic enzyme activity (for example phosphorylase, phosphofructokinase and lactate dehydrogenase)	Low-medium	Medium-very high	High
Myoglobin content	High	Medium-high	Low
Oxidative capacity, mitochondrial enzyme activity (NADH-TR, suinate dehydrogenase stains)	High	Highest	Low
Capillaries per fibre or mm ²	High	Medium	Low

Tabla 2. Características del tipo de fibra de los principales tipos de fibras humanos y murinos. *La miosina de cadena pesada tipo IIB sólo se expresa en el músculo esquelético de roedores, pero no en la mayoría de músculos humanos. El tipo IIX se conoce también como IID. *Tabla adaptada de (Wackerhage 2014).*

1.2. Regeneración del músculo esquelético

El músculo esquelético posee una notable capacidad de regeneración, y tiene como finalidad prevenir la pérdida de masa muscular y las deficiencias locomotoras que conllevan las lesiones musculares (Chargé & Rudnicki 2004). El proceso regenerativo sigue siempre un patrón establecido, independientemente del origen de la lesión, que puede dividirse en tres fases principales (Huard et al. 2002a; Hurme et al. 1991; Järvinen et al. 2007):

1) Fase degenerativa (1-3 días post-lesión): Se caracteriza por la ruptura y necrosis de las miofibras, la fagocitosis de las fibras musculares necróticas y la reacción inflamatoria (Figura 5 A, B).

2) Fase de reparación (comprende de los 2-3 días hasta las 4 semanas post-lesión): Se caracteriza la activación de SCs y la generación de nuevas fibras musculares (Figura 5C).

3) Fase de remodelación (1-3 meses post-lesión): Se caracteriza por la formación y remodelación del tejido cicatricial, la maduración y reorganización de las miofibras en regeneración, incluyendo la formación de un aparato contráctil maduro y la revascularización e inervación de estas (Figura 5 D, E).

Tras la fase degenerativa, la regeneración del músculo lesionado comienza con 2 procesos concomitantes, de apoyo y competitividad simultánea: la reparación de las miofibras afectadas y la formación de una cicatriz de tejido conectivo. Por lo tanto, la progresión equilibrada de ambos procesos es un requisito previo para la recuperación óptima de la función contráctil del músculo (Hurme et al. 1991).

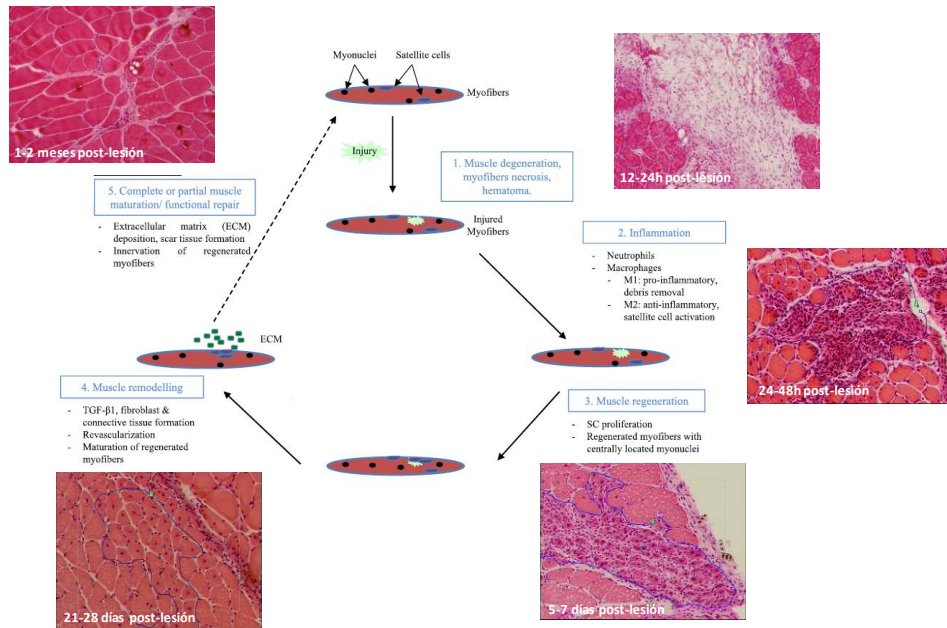


Figura 5. Ciclo secuencial de las fases de la regeneración muscular tras una lesión. sp, zona superficial; de, zona más profunda. *Figura modificada de (Laumonier & Menetrey 2016), (Marotta et al. 2007) y (Contreras-Muñoz et al. 2016).*

1.2.1. Fase degenerativa

1.2.1.1. Necrosis de las miofibras

Cuando el músculo esquelético sufre una lesión, ésta por lo general se extiende a través de toda la sección transversal de las fibras musculares, destruyendo la integridad de la membrana plasmática y la lámina basal de las miofibras y aumentando la permeabilidad y la entrada de calcio extracelular. Se produce entonces la activación de proteasas dependientes de calcio, tales como las calpaínas, que producen una rápida degradación de las miofibrillas y otros constituyentes celulares (Ciciliot & Schiaffino 2010). Existe la amenaza de que la necrosis se extienda desde el inicio de la lesión a lo largo de toda la longitud de la fibra muscular, debido a su morfología alargada. Para evitar esto, la llamada banda de contracción, estructura formada por material condensado del citoesqueleto, actúa como un sistema de *puerta cortafuegos*. De este modo, la propagación de la necrosis

se detiene a nivel local, se sella el defecto en la membrana plasmática y se forma una barrera protectora permitiendo que la membrana plasmática dañada pueda repararse (Hurme et al. 1991).

1.2.1.2. Inflamación

La inflamación local y la formación del hematoma se desarrollan justo después de la lesión, lo que promueve aún más la degeneración muscular (Figura 5 A, B). Además de verse afectadas las miofibras, se produce un daño vascular local, permitiendo que las células inflamatorias tengan acceso al área lesionada (Tidball 1995). Por otro lado, las miofibras que se están degenerando liberan sustancias que sirven como quimioatrayentes, potenciando la extravasación de células inflamatorias al tejido lesionado, con el fin de fagocitar los restos de miofibras (Tidball 1995; Chazaud et al. 2003).

En la fase aguda de la lesión muscular, los leucocitos polimorfonucleares, en este caso los neutrófilos, son las primeras células inflamatorias que entran en el tejido dañado (Hurme et al. 1991; St Pierre Schneider et al. 2002). Éstas sufren un aumento muy significativo durante las primeras horas, alcanzando su máximo entre las 6-24 h después de la lesión. Los neutrófilos son, sin embargo, células de vida corta, siendo prácticamente indetectables 3-4 días después de la lesión (Fielding et al. 1993). Secretan un gran número de moléculas pro-inflamatorias, con el fin de crear un microambiente quimioatrayente para otras células inflamatorias tales como monocitos y macrófagos (Toumi & Best 2003; Chazaud et al. 2009). Poseen, además, la capacidad de liberar proteasas que ayudan a degradar los desechos celulares producidos por la lesión muscular; sin embargo, pueden llegar a liberar altas concentraciones de moléculas citotóxicas y citolíticas, pudiendo dañar el músculo u otros tejidos sanos (Tiidus 1998).

Tras la infiltración de neutrófilos, los siguientes en migrar al tejido lesionado son los monocitos, donde comienzan su diferenciación a macrófagos, convirtiéndose en la célula inflamatoria predominante (Tidball 2005a). Estos fagocitos se han considerado tradicionalmente como eliminadores de desechos necróticos, pero se ha demostrado que presentan actividades opuestas, pro-inflamatorias y/o anti-

inflamatoria; por lo que dos subpoblaciones distintas de macrófagos (M1 y M2) actúan secuencialmente en el tejido muscular lesionado (Chazaud et al. 2009; McLennan 1996) (Figura 6).

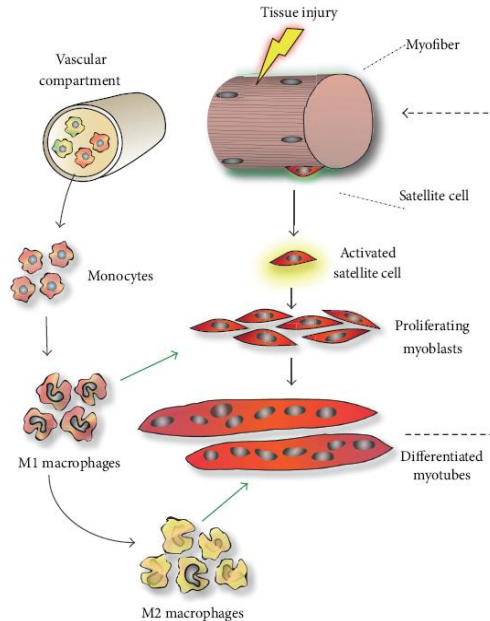


Figura 6. Inflamación y polarización de los macrófagos en la regeneración del músculo esquelético lesionado. Las SC tras la lesión muscular, se activan, proliferan como mioblastos, y posteriormente se fusionan y diferencian en miotubos, los cuales crecerán y reemplazarán el músculo dañado. Los monocitos pro-inflamatorios y los neutrófilos (no mostrados) se extravasados del compartimento vascular poco después del daño, invadiendo las áreas lesionadas donde se diferencian en macrófagos pro-inflamatorios que se parecen fenotípicamente a los macrófagos M1. Estas células limpian el tejido dañado y liberan una serie de citoquinas que estimulan la proliferación de mioblastos. Los macrófagos tipo M2 están presentes localmente en etapas posteriores de regeneración actuando como promotores de la diferenciación y fusión de mioblastos. *Figura extraída de (Kharraz et al. 2013).*

Los macrófagos M1 son los responsables de la fagocitosis del tejido necrótico, secretan además citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF- α) y la interleuquina beta 1 (*Interleukin 1 beta*, IL-1 β). Éstos invaden la zona dañada unas 24 h después de la lesión, alcanzando un pico máximo a los 2 días (Tidball 2005b; Brunelli & Rovere-Querini 2008). La transición de los M1 pro-inflamatorios a los macrófagos M2 anti-

inflamatorios, es esencial para la diferenciación miogénica, ya que promueven la formación de miotubos y atenúan la respuesta inflamatoria (Tidball & Wehling-Henricks 2007; Chazaud 2014). Además de esto, los M2 liberan interleuquina-10 (*Interleukin 10*, IL-10) la cual desempeña un papel clave en la promoción de la fusión y maduración de los miotubos (Arnold et al. 2007; Strle et al. 2007). Éstos alcanzan su máximo aproximadamente 4 días post-lesión y se mantienen hasta bien entrada la fase de remodelación del músculo esquelético (Tidball 2005b; Chazaud et al. 2009).

Aunque los macrófagos son las células inflamatorias predominantes en la regeneración del músculo esquelético, en esta fase, participan otras células como los mastocitos (Gorospe et al. 1996) y los linfocitos T (Wynn 2004).

1.2.2. Fase de reparación

Las fibras musculares no poseen la capacidad de dividirse, por lo que las miofibras dañadas no pueden ser reparadas sin la presencia de unas células madre de músculo adulto, las SC.

1.2.2.1. Células Satélite

Las SC son una subpoblación de células musculares, descritas por primera vez en 1961 por Alexander Mauro, que se mantienen en estado no diferenciado en el músculo adulto (Mauro 1961). Son células mononucleares, quiescentes mitótica y metabólicamente y las principales responsables de la regeneración muscular (Relaix & Zammit 2012; Bischoff 1994; Schultz & McCormick 1994). Se encuentran localizadas entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras musculares y representan entre un 1-5% del total de núcleos presentes en una fibra (Hawke & Garry 2001; Bischoff & Heintz 1994). Bajo condiciones normales, estas células permanecen quiescentes en una etapa temprana del programa miogénico; cuando se produce una lesión muscular, se desencadena su activación, proliferación y pasan a ser MPC o mioblastos adultos (Hawke & Garry 2001; Grounds & Yablonka-Reuveni 1993).

Una característica crucial de las SC es la capacidad de auto-renovación, particularidad única de todas las células madre. Sin ésta, el número de SC disminuiría después de una lesión muscular o durante el mantenimiento normal del tejido (Collins et al. 2005). La progresión del ciclo celular de las SC y la determinación de su destino celular, son controladas por complejos mecanismos reguladores en los cuales están involucrados factores intrínsecos y extrínsecos (Dumont et al. 2015).

Se han propuesto dos mecanismos que dan lugar al mantenimiento de SC: la división asimétrica y simétrica. La división asimétrica da lugar a la formación de dos células hijas, de las cuales una permanece quiescente mientras que la otra experimenta activación y diferenciación miogénica. Alternativamente, las SC puede sufrir división simétrica, en la cual se generan dos SC que pueden permanecer quiescentes o comenzar el ciclo de proliferación y diferenciación miogénica (Dhawan & Rando 2005) (Figura 7).

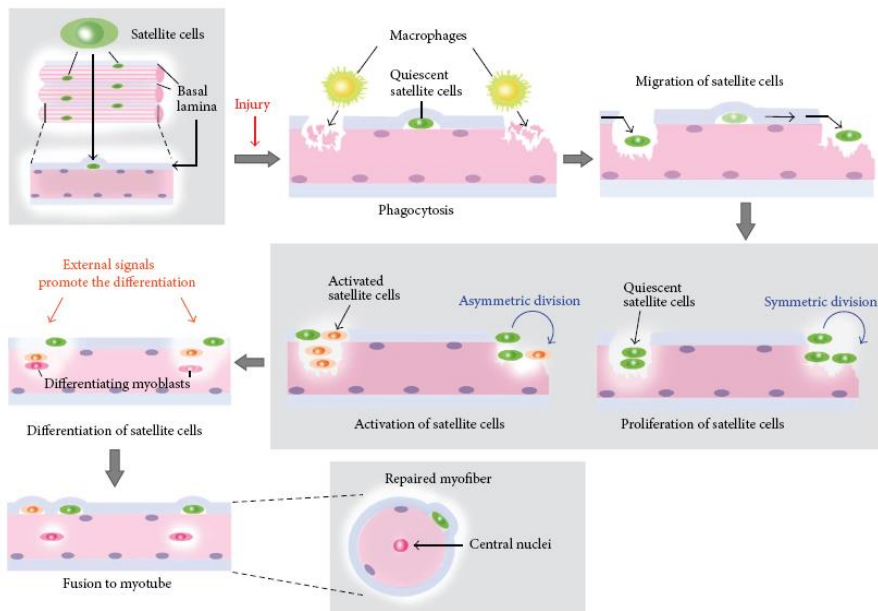


Figura 7. Función de las SC en la regeneración muscular post-lesión. La fibra muscular dañada induce la activación de las SC quiescentes que residen entre la membrana plasmática y la lámina basal. Los macrófagos digieren los restos del tejido de la fibra dañada en el sitio de la lesión (fagocitosis). Las SC migran y proliferan mediante divisiones simétricas y asimétricas. Durante este proceso, varias señales

externas promueven la diferenciación de las SC y su fusión a miotubos. *Figura extraída de (Fujimaki et al. 2013).*

Después de varias rondas de proliferación, las células miogénicas se diferencian y se fusionan para formar una nueva fibra muscular o bien pueden unirse a las fibras dañadas existentes, con el fin de repararlas (Hawke & Garry 2001; Snow 1978). Estas miofibras recién formadas, presentan características morfológicas muy significativas, un calibre mucho más pequeño del normal y mionúcleos situados en el centro de la miofibra (Figura 7). Son además basofílicas (con una alta síntesis de proteínas y ácidos nucleicos) y expresan marcadores específicos de regeneración muscular, como la miosina del desarrollo de cadena pesada (*Developmental Myosin Heavy Chain*, dMHC) que se detecta en las fibras de nueva formación (Ciciliot & Schiaffino 2010; Marotta et al. 2007; Sartore et al. 1982). Con el tiempo, las miofibras adquieren su forma madura aumentando de tamaño, desarrollando estriaciones cruzadas normales y desplazando los mionúcleos a la periferia de la fibra muscular (Hawke & Garry 2001).

1.2.3. Fase de remodelación

Una vez formadas las nuevas miofibras, éstas maduran y se unen a la ECM circundante. La citoquina fibrogénica, TGF- β 1, tiene un papel muy importante en la formación de la cicatriz, ya que participa en la proliferación de fibroblastos y actúa como un agente anti-apoptótico de miofibroblastos, además de promover la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos activados (Lech & Anders 2013). Todo esto, con el objetivo de aumentar la producción de ECM como los colágenos tipo I y III, laminina y fibronectina (Desmoulière & Gabbiani 1995; Lehto, Sims, et al. 1985).

En su fase inicial, la respuesta fibrótica se considera beneficiosa, estabilizando el tejido y actuando como andamio para las miofibras recién regeneradas. Sin embargo, aunque la mayoría de lesiones musculares se reparan sin tejido cicatricial disfuncional; en las lesiones musculares más graves, la proliferación de fibroblastos se puede ver incrementada. Este hecho dará lugar a una síntesis de colágeno excesiva, aumentando el tamaño del tejido cicatricial y pudiendo alterar la función normal del músculo esquelético (Mann et al. 2011; Järvinen 1975).

1.2.3.1. Vascularización, inervación y carga mecánica

Existen tres factores adicionales que poseen un papel crítico en la regeneración del músculo: la inervación de las nuevas fibras musculares, la formación de vasos sanguíneos y la carga y generación de fuerza mecánica.

Vascularización. La restauración del suministro de sangre en el músculo esquelético lesionado es uno de los primeros signos de regeneración muscular, lo que indica que la revascularización juega un papel importante en este proceso (Carlson & Faulkner 1983). Después de un traumatismo, los nuevos capilares surgen de los vasos sanguíneos que sobreviven y se dirigen hacia el centro del área lesionada (Järvinen 1976a); éstos ayudan a mantener los niveles de oxígeno y sustratos necesarios, haciendo posible la regeneración de las fibras y optimizando el metabolismo energético aeróbico (Józsa et al. 1980). Sin este proceso de revascularización, la regeneración muscular se produciría de manera incompleta originando una fibrosis significativa (Best et al. 2013).

Simultáneamente, la expresión de factores angiogénicos aumenta y los marcadores de nuevos capilares como el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF), la angiopoyetina-1 /2 y la alfa-actina de músculo liso (*alpha Smooth Muscle Actin*, α -SMA), pueden ser detectados junto a la formación de nuevas miofibras (Scholz et al. 2003; Wagatsuma 2007).

Inervación. El restablecimiento de los nervios en el músculo que se está regenerando y la formación de nuevas placas terminales motoras, no sólo confieren control funcional al nuevo músculo, sino que sus efectos quimiotrópicos y estimulantes también influyen en el tipo, la alineación y el tamaño de la fibra muscular (Lefevre et al. 1996). Si las conexiones neuromusculares no se restablecen, el músculo regenerado sufrirá un proceso de atrofia (Järvinen et al. 2007; Järvinen et al. 2005).

Carga mecánica. Las células perciben su entorno a través del anclaje y el arrastre de la ECM en la que residen; por lo tanto, la tensión producida por la carga mecánica, se transmite a las células residentes influyendo en su fenotipo (Xu et al. 2009). La formación de un músculo esquelético funcional depende en parte de la correcta

alineación de las nuevas fibras, que dirigen las fuerzas contráctiles mientras se genera de nuevo la red neurovascular.

1.2.4. Regulación de la regeneración muscular

El complejo proceso de reparación muscular, depende de una respuesta orquestada de factores de crecimiento y proteínas tanto celulares como extracelulares, que definen el microambiente responsable de estimular y coordinar la regeneración del músculo esquelético. Estos factores son secretados tanto por las propias fibras musculares tras sufrir una lesión como por células inmunes activas, los vasos sanguíneos o el tejido conjuntivo (Chargé & Rudnicki 2004; Grounds & Yablonka-Reuveni 1993; Ciciliot & Schiaffino 2010); sin embargo, la composición exacta de esta mezcla de factores sigue siendo desconocida.

Los factores de crecimiento y citoquinas más estudiados son HGF, los factores de crecimiento insulínico (*Insulin-like Growth Factors*, IGFs), FGFs, TGF- β , miembros de la familia de citoquinas interleuquinas-6 (*Interleukin 6*, IL-6) y TNF- α (Figura 8).

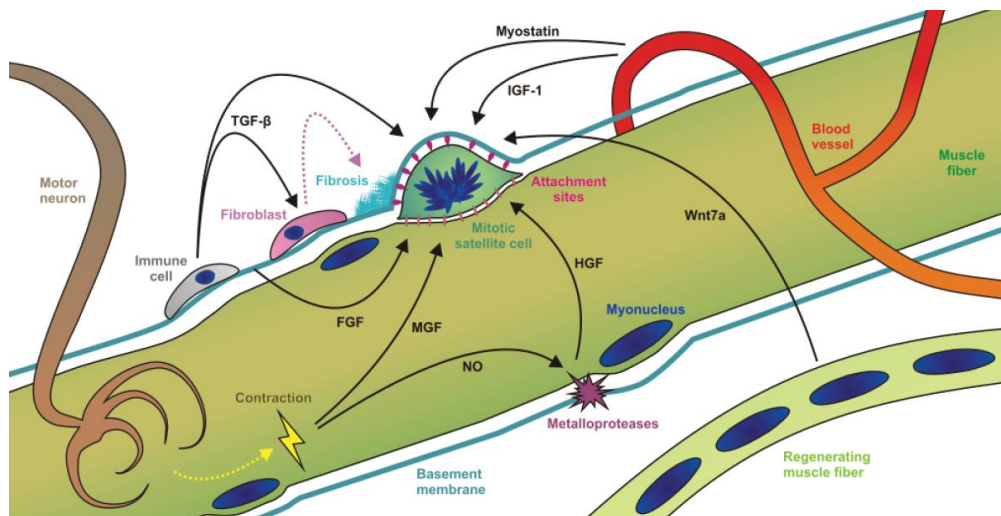


Figura 8. Esquema de los diferentes factores y estímulos ambientales implicados en la regulación de las SC en el músculo esquelético. FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; IGF, factor de crecimiento insulínico; MGF, factor de crecimiento mecánico; NO, óxido nítrico; TGF, factor de crecimiento transformante. *Figura extraída de (Bentzinger et al. 2010).*

1.2.4.1. HGF

En el músculo esquelético, el HGF está implicado en la miogénesis y regeneración del tejido lesionado (Miller et al. 2000; Gal-Levi et al. 1998), es además, el principal regulador de la proliferación de las SC, con la capacidad de activar aquellas que se encuentran en estado quiescente (Allen et al. 1995).

1.2.4.2. IGFs

El músculo esquelético segrega dos tipos de IGFs: tipo I y II, ambos factores presentes en la regulación de la regeneración muscular (Allen & Boxhorn 1989; Levinovitz et al. 1992). IGF-I contribuye a la hipertrofia del músculo esquelético a través de la activación y proliferación de las SC, de la expresión génica específica de los músculos y de la síntesis de proteínas (Philippou et al. 2007). IGF-2, en cambio, se expresa más tarde y está implicado en la diferenciación muscular (Florini et al. 1996). Así mismo, los IGFs, pueden también estar implicados en la innervación del tejido tras una lesión muscular (Vergani et al. 1998).

1.2.4.3. Familia TGF

Los miembros de la familia de TGF- β han sido reconocidos como moduladores de la actividad de mioblastos, inhibiendo tanto su proliferación como su diferenciación (Allen & Boxhorn 1989; Lefaucheur & Sébille 1995a). Por tanto, la limitación por parte de TGF- β 1 en la regeneración muscular, induce la formación de tejido cicatricial (Järvinen et al. 2005; O’Kane & Ferguson 1997). Éste permanece unido a la ECM (Wipff & Hinz 2008), con el fin de liberarse durante la lesión muscular, momento en el que además, actúa como quimioatrayente para los macrófagos (Shen et al. 2008).

La miostatina (*Myostatin*, *MSTN/Growth Differentiation Factor 8*, *GDF-8*) es otro miembro de la familia TGF- β que puede regular la masa muscular funcionando como un inhibidor de la proliferación de las SC (McPherron et al. 1997; McCroskery et al. 2003).

1.2.4.4. FGFs

Entre las diferentes isoformas de FGFs (FGF-1 - FGF-9), FGF-6 es la única restringida al músculo esquelético, expresándose durante la fase regenerativa (Floss et al. 1997). Se han descrito varios FGFs como potentes activadores de la proliferación MPC y como inhibidores de su diferenciación (Allen & Boxhorn 1989; Yablonka-Reuveni et al. 1999; Kästner et al. 2000). Sin embargo, su papel en la regeneración muscular sigue siendo poco claro.

1.2.4.5. Familia de Citoquinas IL6

El factor inhibidor de leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor*, LIF) e IL-6, son miembros de la familia de las interleuquinas, las cuales son producidas por muchos tipos celulares, como mioblastos y macrófagos. IL-6 promueve la degradación del tejido necrótico, sincroniza el ciclo celular de las SC e induce la apoptosis de los macrófagos después de una lesión muscular. Se expresa en el músculo esquelético a niveles muy bajos durante la etapa de reposo, pero aumenta rápidamente después del ejercicio (Pedersen & Febbraio 2008) y durante la regeneración muscular (Kurek et al. 1996). IL-6 promueve además, la proliferación miogénica de las SC, la formación de miotubos y está involucrada en la remodelación de la ECM (Serrano et al. 2008; Baeza-Raja & Muñoz-Cánoves 2004; White et al. 2009).

Por otro lado, LIF está implicado en diferentes actividades biológicas de la regeneración muscular, incluyendo la estimulación de la proliferación de mioblastos y su diferenciación (Kurek et al. 1997).

1.2.4.6. TNF- α

TNF- α , es un mediador central de la inflamación celular y de las vías de señalización apoptóticas. Las fibras musculares son también una fuente de TNF- α (Saghizadeh et al. 1996), donde ha demostrado su importancia en la proliferación de SC durante las primeras etapas de la reparación del músculo (Chen et al. 2005; Warren et al. 2002).

Muchos otros factores pueden estar implicados en la regulación de las SC en el músculo esquelético adulto, como por ejemplo, el óxido nítrico (*Nitric Oxide*, NO) (194), los factores de crecimiento derivados de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factors*, PDGF) (Christov et al. 2007), el VEGF (Christov et al. 2007) y la testosterona (Joubert & Tobin 1995) (Figura 8).

1.3. Deporte y músculo esquelético

El ejercicio es uno de los principales moduladores de plasticidad muscular, desencadena vías de señalización intracelular que median el crecimiento muscular y su adaptación, llevándose a cabo a través de cambios en la estructura y función de las proteínas contráctiles (Gür et al. 2003), en las SC y mionúcleos (Mackey et al. 2014), en la homeostasis mitocondrial (Cobley et al. 2015), en el perfil metabólico (Laye et al. 2015) y en la densidad capilar muscular (Cocks & Wagenmakers 2016).

Aunque la mayoría de los músculos esqueléticos humanos están compuestos de una mezcla de distintos tipos de fibras, la composición del músculo puede cambiar en función del tipo de ejercicio y rendimiento al que es sometido (Andersen et al. 2000), ya sea con la estimulación neuromuscular (Doucet et al. 2012) o con la carga mecánica (Maffei et al. 2014). Una estimulación nerviosa frecuente, desencadena un aumento en el Ca^{+2} citosólico libre (Salmons & Sréter 1976); éste tiene la capacidad de regular a la calcineurina, una enzima serina-treonina fosfatasa que juega un papel importante en la regulación génica específica del tipo de fibra. De hecho, su expresión promueve la actividad de los genes de las fibras de tipo I, mientras que su inhibición suscita la actividad de genes específicos de las fibras de tipo II (McCullagh et al. 2004). En organismos modelo, cuando se aplican estímulos extremos y suprafiológicos en el músculo esquelético, se pueden cambiar en gran medida las proporciones del tipo de fibra dentro de un músculo. El ejercicio de resistencia generalmente promueve un cambio de tipo de fibra limitado, que implica una disminución del tipo IIx y un aumento de las fibras de tipo IIa (Gollnick et al. 1973). Por otro lado, en aquellos que tienen un bajo porcentaje de fibras tipo I, puede ocurrir un cambio significativo, de tipo de fibra II a tipo I (Trappe et al. 1995). Sin

embargo, es difícil desentrañar los efectos del ejercicio a largo plazo de los efectos derivados del propio envejecimiento muscular (Lexell et al. 1988).

La actividad contráctil que produce el ejercicio, genera moléculas reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) y de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS) en el músculo esquelético. Éstas pueden modular positiva o negativamente la generación de fuerza muscular en función de la concentración y/o el tiempo de formación de ROS (Derbre et al. 2012), y juegan un papel importante en la contracción inducida por la adaptación muscular (Kang et al. 2009).

El aumento de la actividad muscular, tiene un efecto positivo en la regulación de las SC, promoviendo su proliferación (Darr & Schultz 1987; Bazgir et al. 2017), por el contrario, este número va disminuyendo gradualmente durante el *detraining* o desentrenamiento deportivo, lo que hace pensar que el ejercicio continuo es necesario para mantener una población rica de SC en el músculo esquelético (Kadi et al. 2004). A pesar de que el ejercicio, ejerce efectos moduladores en las diferentes etapas del ciclo de vida de las SC, existe una gran inconsistencia con respecto a las respuestas que desencadenan los diferentes tipos de ejercicio. Se deben tener en cuenta, por tanto, parámetros como la frecuencia, la intensidad, la duración y el tipo de ejercicio. Como se observa en la Tabla 3, la activación de las SC se puede modular a través de distintas vías (Bazgir et al. 2017; Qaisar et al. 2016). Sin embargo, determinar la cantidad exacta, la duración y el umbral del entrenamiento para la activación óptima de SC en sujetos con diferentes niveles de aptitud física, edad y género, actualmente es extremadamente difícil.

El músculo esquelético activo y el tejido circundante, inducidos por el ejercicio, tienen la capacidad de liberar sustancias inflamatorias, citoquinas y factores de crecimiento, desencadenando también la activación de las SC (Kadi et al. 2005). Un ejemplo de esto, es el aumento significativo de IGF registrado en humanos tras la realización de ejercicio (Hellsten et al. 1996). Dos de las isoformas de IGF-I, el factor de crecimiento mecánico (*Mechano Growth Factor*, MGF o IGF-1Ec) e IGF-IEa, intervienen en este proceso, donde el MGF inicia la activación y proliferación de las SC e IGF-IEa promueve la diferenciación terminal de los miotubos (Yang & Goldspink 2002).

Mode of intervention		Effects on SC activation	References
Resistance exercise (RE)	ST	↑	(73, 75-82, 88, 114, 115)
	LT	↑	(32, 38, 39, 92, 95-97, 116)
Endurance exercise	ST	↔ ↑	(59, 117, 118)
	LT	↔ ↑	(68-70, 79, 115, 116)
Supplements and exercise	ST	↔ ↑	(84, 85, 118, 119)
	LT	↑↔	(84, 98-100, 119)
Sprint exercise	ST	?	-
	LT		(66)
Concurrent exercise	ST	↓↑	(98, 123-125)
	LT	?	-
HIIT	ST	↑	(76, 126)
	LT	?	-
BFRE		↑	(83, 84)
Electrical stimulation		↑	(74)
Irradiation		↓	(28, 39)
Drug and exercise		↓	(71)

Tabla 3. Efecto de diversos ejercicios/intervenciones a corto y largo plazo en la activación de SC. ST, corto plazo; LT, largo plazo; HIIT, entrenamientos con intervalos de alta intensidad; BFRE, ejercicios con restricción del flujo sanguíneo; ↓, descenso; ↔, sin cambios; ↑, Aumento y ? indeterminado. *Tabla extraída de (Bazgir et al. 2017).*

El ejercicio físico aumenta las concentraciones séricas de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), que digieren directamente el tejido fibroso cicatricial y regulan la secreción de factores de crecimiento pro-regenerativos como IGF (Bedair et al. 2007; Fowlkes et al. 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión del gen de la miostatina, disminuye tras la práctica de ejercicio excéntrico y de resistencia, pudiendo jugar un papel importante en la hipertrofia muscular inducida por el ejercicio (Willoughby 2004; Hulmi et al. 2007).

Existe una evidencia clara de que el ejercicio promueve la perfusión del músculo esquelético, aumentando la difusión de nutrientes y mitógenos e induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como la expansión de las ramas vasculares existentes (Suhr et al. 2007). Se produce además, un aumento en la secreción de VEGF en respuesta al ejercicio (Gavin et al. 2006; Morici et al. 2005), estimulando la proliferación y la migración de las SC (Germani et al. 2003; Arsic et al. 2004). En un estudio de Christov y colaboradores, se demostró que el número de

SC en el músculo esquelético humano se correlaciona directamente con la capilarización (Christov et al. 2007).

El músculo esquelético experimenta un cierto nivel de hipoxia tisular (descenso de aporte de oxígeno a los tejidos) como resultado del entrenamiento físico. Esta hipoxia inducida por el ejercicio promueve la cicatrización del músculo esquelético elevando las concentraciones circulantes del factor 1 inducible por hipoxia (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*, HIF-1 α) (Forsythe et al. 1996; Semenza 2016), el factor derivado de células estromales y la eritropoyetina, cada una de las cuales moviliza las células madre progenitoras endoteliales de la médula ósea para coordinar la neovascularización de los tejidos hipóxicos (Fandrey 2004; Bahlmann et al. 2004; Beaudry et al. 2016).

1.4. Lesiones deportivas musculares humanas

Las lesiones producidas en el músculo esquelético, son las más comunes en el ámbito deportivo (su frecuencia puede alcanzar hasta el 55% dependiendo del tipo de deporte), es por tanto una gran preocupación en la medicina deportiva (Järvinen et al. 2005; Best & Hunter 2000). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las lesiones músculo-esqueléticas son la causa más habitual de dolor severo a largo plazo y discapacidad física, afectando a cientos de millones de personas en todo el mundo (Woolf & Pfleger 2003).

1.4.1. Tipos de lesiones

El trauma mecánico es la lesión muscular con mayor incidencia en el ámbito deportivo, resultando a menudo con la incapacidad del atleta para entrenar o competir durante varias semanas (Huard et al. 2002b). Más del 90% de todas las lesiones derivadas de la práctica de deporte, provienen de una rotura muscular por estiramiento excesivo (distensión muscular) o contusiones. Las laceraciones musculares, se encuentran en un segundo plano, con una frecuencia considerablemente menor (Järvinen et al. 2005). Todas estas lesiones se

caracterizan por sufrir rotura de sus fibras musculares, lámina basal y capilares cercanos (Huard et al. 2002b; Järvinen et al. 2005).

La lesión por distensión se produce cuando las fibras musculares se ven sometidas a una fuerza de tracción excesiva. Por lo general, esto ocurre cuando el músculo está involucrado en una contracción excéntrica, originándose fuerzas de tracción opuestas de manera simultánea y dando lugar a un estiramiento forzado y excesivo, haciendo que el músculo sea susceptible al desgarro (Järvinen et al. 2000; Beltran et al. 2012). Este tipo de lesión se genera con frecuencia en la MTJ, donde se concentra una fuerza mayor (Beltran et al. 2012; Ali & Leland 2012). Así mismo, los músculos que están conectados a más de una articulación (como el gastrocnemio, recto femoral e isquiotibiales) son los más susceptibles a las distensiones (Ali & Leland 2012), debido a que tienen que soportar grandes fuerzas internas y cambios rápidos tanto en la longitud muscular como en el modo de contracción.

La contusión muscular se produce cuando el tejido es sometido a una fuerza de compresión extrínseca, repentina y pesada, como un golpe directo (Järvinen et al. 2007). En un músculo contraído, la lesión que se genera suele ser más superficial que en uno relajado, ya que frecuentemente la presión del impacto hace que el músculo se comprima contra la superficie del hueso (Crisco et al. 1996). Este tipo de lesión ocurre a menudo en deportes de equipo, en los cuales el contacto entre los atletas es mayor, como en el fútbol, baloncesto y balonmano. Los síntomas de este tipo de lesión son variados y no siguen un patrón definido; sin embargo, generalmente hay dolor, un rango limitado de movimiento o una combinación de ambos (Järvinen et al. 2005).

1.4.2. Clasificación

El cuadro clínico de una lesión muscular depende fundamentalmente de la gravedad y de la naturaleza del hematoma. Los vasos sanguíneos intramusculares se rasgan fácilmente como resultado del trauma, dando lugar a un hematoma intra- e intermuscular. En el caso del hematoma intramuscular, se produce un aumento de presión dentro de la fascia muscular, que permanece intacta, debido a la sangre extravasada, comprimiendo los vasos sanguíneos y limitando el tamaño del

hematoma. Por el contrario, un hematoma intermuscular, se desarrolla si la fascia que rodea al músculo se rompe y el derrame de sangre extravasada tiene acceso libre a los espacios intersticiales e interfaciales circundantes, sin un aumento significativo en la presión dentro del músculo, pero con una pérdida mayor de sangre.

La forma más leve de lesión por distensión es representada por el llamado dolor muscular de aparición tardía (*Delayed Onset Muscle Soreness*, DOMS), conocido comúnmente como *agujetas*; se caracteriza por desencadenar rigidez y dolor en los días que siguen al ejercicio realizado, desapareciendo generalmente en una semana. El DOMS es producto de un ejercicio extenuante o un esfuerzo no habitual provocado por el trabajo excéntrico, en el cual se produce una disrupción física de los sarcómeros, debido a un sobreestiramiento heterogéneo de los mismos durante la contracción y una pérdida de homeostasis Ca^{2+} derivada de la alteración del sistema de acoplamiento excitación-contracción (Proske & Allen 2005). DOMS puede causar un aumento de los niveles de creatina quinasa en sangre y la activación y proliferación de SC, sin embargo, la necrosis de miofibras y la regeneración muscular no están presentes en este caso (Aärimaa et al. 2004).

En la actualidad, existe una gran controversia en lo que se refiere a la clasificación de las lesiones músculo-esqueléticas; ocasionando limitaciones en su estudio y discrepancias en su descripción y categorización (Hamilton et al. 2014). Existen varios sistemas de clasificación y graduación de lesiones musculares (O'Donoghue 2002; Hamilton et al. 2014), tanto para músculos específicos (ElMaraghy & Devreux 2012; Jackson & Feagin 1973), como para grupos musculares (N. Malliaropoulos et al. 2010; Cohen et al. 2011). Algunos de estos sistemas de clasificación se basan en estudios clínicos (O'Donoghue 2002) o estudios de imagen (Möller et al. 2002; Chan et al. 2012), mientras que otros son una combinación de ambos (Mueller-Wohlfahrt et al. 2013; Pollock et al. 2014).

Basándonos en la última clasificación propuesta por Pollock y colaboradores (Pollock et al. 2014), con las imágenes de resonancia magnética (RM) como herramienta de diagnóstico; las lesiones del músculo esquelético se pueden clasificar en 4 grados diferentes:

a) Grado I: Lesión muscular pequeña. Caracterizada por un cambio de señal más elevado (edema en T2) en el sitio de la lesión que se extiende sobre un área limitada de menos de 5 cm y ocupa menos del 10% del área de la sección transversal de su punto máximo.

b) Grado II: Lesión muscular moderada. El cambio de señal más elevado por RM, ocupa entre 10 y 50% del área de la sección transversal en el sitio de la lesión o se extiende entre 5 y 15 cm dentro del músculo. La interrupción arquitectónica de las fibras normalmente es menor de 5 cm.

c) Grado III: Lesión muscular extensa. El cambio de señal más elevado por RM, ocupa más del 50% % del área de la sección transversal del músculo o tiene más de 15 cm de longitud. La interrupción arquitectónica de las fibras es probable que sea mayor de 5 cm.

d) Grado IV: Son las lesiones más graves y se caracterizan por un desgarro completo del músculo o del tendón.

1.4.3. Herramientas de diagnóstico

En la clínica deportiva humana, el diagnóstico de las lesiones musculares comienza con el historial de la ocurrencia del trauma, seguido por un examen clínico y una prueba de función de los músculos lesionados con y sin resistencia externa. El diagnóstico es fácil cuando la contusión o distensión muscular va acompañada de evidencias objetivas de hinchazón y/o equimosis (hematoma), pero se vuelve más complejo con hematomas pequeños o localizados en la cara interior del músculo. Las modalidades de imagen como la ecografía, la tomografía computarizada (TC) o la RM son importantes para diferenciar entre lesiones estructurales y trastornos funcionales, o para determinar la extensión de la lesión (Järvinen et al. 2005; Almekinders 1991) (Figura 9).

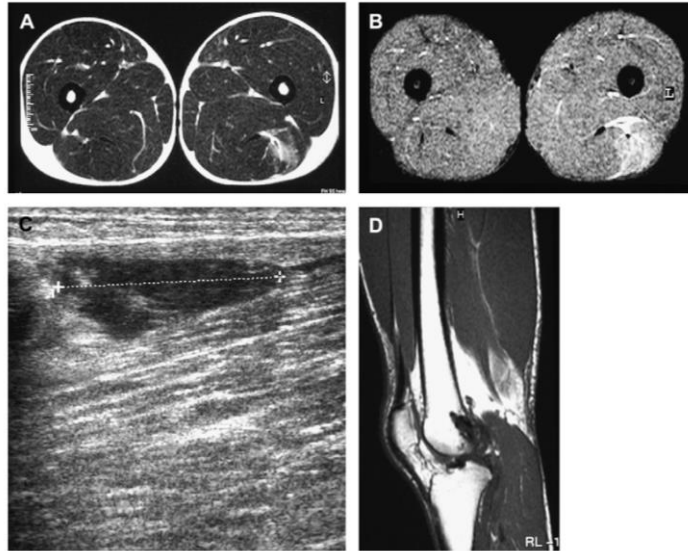


Figura 9. Imágenes por RM (A) ponderadas en T2 y (B) secuenciadas en STIR para neutralizar la señal de la grasa de una distensión muscular de grado I en el músculo isquiotibial. Imágenes longitudinales por (C) US y (D) imagen por RM de una rotura de la inserción muscular en el músculo isquiotibial. *Figura extraída de (Järvinen et al 2007).*

La ecografía se considera una herramienta de primera línea cuando se necesita tener una caracterización muy exacta de la lesión; sin embargo, tiene una clara desventaja, es altamente dependiente de la experiencia del radiólogo. La RM, a su vez, es muy útil cuando existe una clara discrepancia entre los síntomas del paciente, los hallazgos del médico o la ecografía. Ha demostrado además, su superioridad sobre la ecografía en las lesiones que se localizan cerca de la MTJ (Aspelin et al. 1992; De Smet & Best 2000) y puede confirmar o descartar con precisión la existencia y una caracterización más detallada de la lesión muscular (Järvinen et al. 2007).

1.5. Práctica clínica en lesiones musculares humanas y alternativas terapéuticas

Una de las mayores preocupaciones en los atletas profesionales es conseguir una rápida y total recuperación después del trauma (Bubnov et al. 2013). A pesar de que el músculo esquelético tiene la capacidad de regenerarse después de la lesión, el

proceso de reparación es lento y a menudo la recuperación funcional es incompleta o deriva en una cicatriz intramuscular, lo que desencadena un importante riesgo de recurrencia (Huard et al. 2002b). Las consecuencias de un tratamiento fallido pueden ser muy dramáticas, posponiendo el *return-to-play* o vuelta a la competición durante semanas o incluso meses. Por tanto, se hace indispensable el conocimiento de los principios básicos de la regeneración del músculo esquelético, ya que éstos podrían ayudar considerablemente tanto a acelerar el regreso a la normalidad como a evitar nuevas lesiones (Järvinen et al. 2013).

El protocolo o principio RICE (*Rest* (Descanso), *Ice* (hielo), *Compression* (Compresión) *and Elevation* (Elevación)), es el tratamiento más comúnmente utilizado en las lesiones músculo-esqueléticas. El objetivo principal de este procedimiento es minimizar las consecuencias de la lesión. Sin embargo, debemos subrayar que no se han registrado suficientes evidencias en ensayos clínicos aleatorizados (ECA) que validen la eficacia del principio RICE en el tratamiento de la lesión de los tejidos blandos (Bleakley et al. 2004).

Rest. La prueba más convincente del valor de uso, se ha obtenido en estudios sobre los efectos de la inmovilización en la curación muscular (Järvinen et al. 2005). Al colocar la extremidad lesionada en reposo inmediatamente después del trauma, se puede prevenir parte de la retracción de los músculos lesionados, reducir el tamaño del hematoma y, posteriormente, el tamaño de la cicatriz de tejido conjuntivo (Järvinen et al. 2005). *Ice.* El uso temprano de la crioterapia se asocia con un hematoma significativamente menor, disminuyendo la inflamación y la necrosis tisular; por lo que se acelera en cierto modo la regeneración temprana (Deal et al. 2002; Schaser et al. 2007). *Compression.* Aunque reduce el flujo sanguíneo intramuscular en el área lesionada (Thorsson et al. 1997), es discutible si la compresión aplicada inmediatamente después de la lesión acelera la cicatrización del músculo esquelético lesionado (Thorsson et al. 1997). *Elevation.* Por último, la justificación para el uso de la elevación, se basa en los principios básicos de fisiología y traumatología; la elevación de una extremidad lesionada por encima del nivel del corazón produce una disminución de la presión hidrostática reduciendo la acumulación de líquido intersticial.

1.5.1. Terapias alternativas

1.5.1.1. Tratamiento farmacológico

El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se proponen a menudo como analgésico en la fase temprana de las lesiones musculares (Paoloni et al. 2009; Ziltener et al. 2010). Los efectos de los AINE han sido bastante bien documentados experimentalmente (Rahusen et al. 2004), en los que se demuestra que su uso a corto plazo en la fase temprana de la reparación muscular, podrían disminuir la reacción inflamatoria, sin efectos adversos. Sin embargo, los datos traslacionales demuestran que los beneficios iniciales del uso de AINE podrían ser menores de lo esperado (Reynolds et al. 1995; Mishra et al. 1995; Obremsky et al. 1994), pudiendo incluso afectar negativamente a la regeneración muscular (Reurink et al. 2014).

Así como el uso temprano y a corto plazo de los AINEs puede considerarse un tratamiento relativamente bien justificado, la situación parece ser completamente opuesta con respecto a los glucocorticoides (Beiner et al. 1999). Los experimentos realizados con modelos animales, mostraron que el tratamiento de lesiones musculares con glucocorticoides, retrasa la eliminación del hematoma y el proceso de regeneración, reduciéndose además la fuerza biomecánica de los músculos lesionados (Beiner et al. 1999). Sin embargo, en clínica humana, se han registrados algunos casos en los que las inyecciones intramusculares condujeron a mejorías tanto en la intensidad de dolor como en el return-to-play (Levine et al. 2000; Stevens et al. 2010).

1.5.1.2. Terapia por ultrasonido

El ultrasonido (US) usado como método terapéutico se aplica de manera extendida en el tratamiento de lesiones musculares, tanto para el alivio del dolor como para potenciar la regeneración muscular (Shanks et al. 2010). Según Backer y colaboradores (Baker et al. 2001), la vibración acústica producida por el ultrasonido, induce cambios celulares que modifican el gradiente de concentración de moléculas, como los iones calcio y potasio, estimulando la actividad celular. Este hecho puede

dar lugar al aumento de la síntesis y secreción de proteínas, la proliferación de fibroblastos y la estimulación de la angiogénesis, entre otros. Sin embargo, la eficacia de esta terapia sigue siendo controvertida. Mientras que algunos autores han observado resultados positivos con su uso, (Rantanen et al. 1999; Karnes & Burton 2002) otros por el contrario no han obtenido efectos beneficiosos (Wilkin et al. 2004; Markert et al. 2005). Factores como la intensidad y frecuencia del tratamiento con ultrasonido, la falta de calibración del dispositivo y de un protocolo para determinar la dosis específica para cada individuo, pueden contribuir a la divergencia de dichos resultados (Shanks et al. 2010).

1.5.1.3. Oxigenoterapia hiperbárica

La oxigenoterapia hiperbárica (OHB) se ha propuesto como otra prometedora opción terapéutica (Best et al. 1998). Un estudio experimental demostró que la aplicación de OHB durante la fase temprana de la reparación, acelera considerablemente la recuperación del músculo tras sufrir una lesión (Best et al. 1998). Sin embargo, un meta-análisis que correlaciona lesiones en tejidos blandos y el tratamiento con OHB demostró la falta de estudios clínicos existentes que evalúen los efectos de la OHB en lesiones musculares graves. Así mismo, los ECA en lesiones menos graves, no mostraron efectos beneficiosos en el músculo u otros tipos de lesiones de tejidos blandos en atletas (Bennett et al. 2005).

1.5.2. Rehabilitación activa temprana como herramienta terapéutica

Un período corto de inactividad física (llevada a cabo en forma de inmovilización) después de una lesión muscular es necesario y beneficioso para una recuperación rápida y completa. La inmovilización permite que se forme el tejido conjuntivo temprano en la zona de la lesión con el fin de obtener la resistencia necesaria para soportar las fuerzas de contracción y evitar así el riesgo de *re-injury* (Järvinen 1975; Järvinen 1976b; Buckwalter 1995). Las lesiones recurrentes, además, son la causa de los mayores tiempos en *return-to-play* dentro del ámbito deportivo, por lo que evitarlas resulta importante (Brooks et al. 2006).

Sin embargo, si la inmovilización se prolonga, el músculo lesionado podría experimentar atrofia muscular, una deposición excesiva de tejido conjuntivo y un retraso de la recuperación de la fuerza muscular (Järvinen et al. 2013; Baoge et al. 2012; Delos et al. 2013). Por tanto, la inmovilización inicial debe ser seguida de una movilización temprana. Ésta, llevada a cabo en forma de rehabilitación activa temprana fue recomendada como tratamiento de traumatismos musculares por primera vez por el Dr. Woodard en 1953 (Kujala et al. 1997).

Uno de los objetivos iniciales de la rehabilitación de las lesiones musculares humanas es restaurar la funcionalidad y el control neuromuscular normal y prevenir la formación de fibrosis tisular (Heiderscheidt et al. 2010). Los ejercicios terapéuticos, como el fortalecimiento isométrico y los movimientos activos controlados, deben iniciarse gradualmente (es decir, dentro de los límites del dolor) y tan pronto como sea posible, ya que han demostrado acelerar e intensificar la fase de regeneración de las fibras musculares esqueléticas lesionadas, así como la angiogénesis (Huard et al. 2002a; Kannus et al. 2003). Se ha demostrado además, que el ejercicio físico y la carga mecánica son esenciales para la maduración de las MTJ, la remodelación muscular y la disminución de la formación de fibrosis después de la lesión (Järvinen & Lehto 1993; Faria et al. 2008; Gregory et al. 1995).

En una fase intermedia del programa de rehabilitación, se permite un aumento en la intensidad de los ejercicios, con entrenamiento neuromuscular a amplitudes más altas e iniciación del entrenamiento con resistencia excéntrica (Sherry et al. 2015). Por último, en la fase final se recomienda aumentar el entrenamiento excéntrico y el neuromuscular específico de alta velocidad, con el fin de preparar a los deportistas para el *return-to-play* (Järvinen et al. 2005; Askling et al. 2014).

La rehabilitación activa temprana es necesaria también, para la recuperación de la flexibilidad y la resistencia del músculo esquelético lesionado. Se debe prestar especial atención, por lo tanto, en la agilidad progresiva y los ejercicios de estabilización del tronco, ya que éstos parecen dar mejores resultados que los programas basados exclusivamente en el estiramiento y el fortalecimiento del músculo lesionado (Järvinen et al. 2007).

1.6. Estudio de nuevas terapias en modelos pre-clínicos que imitan la patología deportiva

La medicina regenerativa busca aprovechar el potencial de la biología celular para el restablecimiento de la funcionalidad perdida del tejido, planteando nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de las lesiones musculo-esqueléticas. Las terapias que se encuentran en desarrollo actualmente, se centran en la mejora de la regeneración muscular y se basan en las diferentes fases de este proceso, con diferentes niveles de éxito. Están relacionadas con la regulación de la inflamación, la aceleración del proceso de regeneración y la prevención del exceso de fibrosis (Chan et al. 2003; Negishi et al. 2005) (Figura 10). Las terapias biológicas actuales incluyen principalmente la terapia celular, la bioingeniería de tejidos y la administración de factores de crecimiento (Huard et al. 2002b; Longo et al. 2012; Juhas & Bursac 2013; Quintero et al. 2009; Andia & Maffulli 2017).

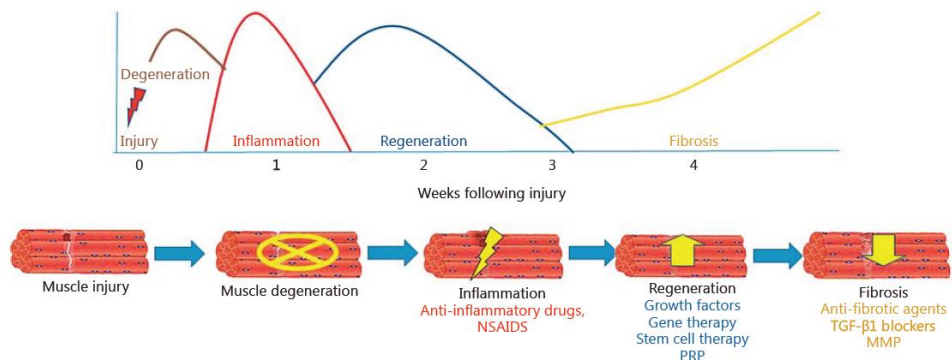


Figura 10. Terapias biológicas para mejorar la regeneración del músculo esquelético basadas en las diferentes fases del proceso de regenerativo. *Figura extraída de (Huard et al 2016).*

1.6.1. Modelos animales de lesiones musculares

Existen grandes similitudes entre las fases de degeneración y reparación en los diferentes tipos de músculos y tras distintos tipos de lesiones, sin embargo, la cinética y la amplitud de cada fase pueden variar dependiendo de la extensión de la lesión, del músculo lesionado o del modelo animal (Irintchev & Wernig 1987; Lefaucheur & Sébille 1995b; Pavlath et al. 1998). Por lo tanto, para estudiar este proceso de forma controlada, ha sido necesario desarrollar modelos animales de lesión muscular con el objetivo de reproducir las lesiones observadas en el músculo esquelético humano. Estos modelos de experimentación animal desempeñan un papel importante en la comprensión de las enfermedades humanas y en el desarrollo de nuevas terapias (Chargé & Rudnicki 2004).

El modelo animal con mayores similitudes a la lesión muscular por contusión en humanos, es provocado por un impacto contundente (no penetrante) en la zona que se quiere lesionar (Puntel et al. 2011; Takeuchi et al. 2014; Crisco et al. 1994; Järvinen 1976b). Sin embargo, en los estudios realizados, se han utilizado diferentes alturas, pesos y forma de los objetos con los que generar el trauma; por lo que es común que las lesiones difieran en términos de carga de impacto y gravedad (Crisco et al. 1996; Kami & Senba 2002).

Los modelos de distensión muscular más utilizados, se pueden dividir en dos grupos principales: los que usan la estimulación eléctrica del músculo para simular contracciones excéntricas (Ingalls, Warren & Armstrong 1998; Song et al. 2012; Song et al. 2004) y aquellos que usan la tracción del músculo para provocar la lesión por estiramiento (He et al. 2008; Ramos et al. 2012). En función del tipo de estimulación empleada, este primer grupo puede clasificarse en dos tipos: el primero activa un nervio muscular específico mientras la articulación está en movimiento (Butterfield & Herzog 2006) y el segundo utiliza electrodos colocados directamente en la piel o subcutáneos para estimular el músculo eléctricamente (Song et al. 2004).

Por otro lado, el uso de miotoxinas como la bupivacaína (Marcaine), la cardiotoxina (CTX) y la notexina (NTX) es un método ampliamente utilizado para inducir necrosis y regeneración muscular, sin embargo, pueden generar efectos biológicos colaterales interfiriendo en el proceso de regeneración natural o en la interpretación

de los resultados (Yan et al. 2003; D'Albis et al. 1988; Harris & Johnson 1978; Plant et al. 2005; Marotta et al. 2007). Además de los ya citados, existen muchos otros modelos animales, tales como la generación de la lesión con una inyección intramuscular de solución salina (Schmalbruch 1976), por pérdida muscular volumétrica (Wu et al. 2012; Corona et al. 2013), por desvascularización-denervación (Lefaucheur & Sébille 1995a) o por criolesión (Puntel et al. 2013).

1.6.2. Terapia con factores de crecimiento

Los factores de crecimiento, juegan un papel importante en las diferentes etapas de la regeneración muscular, lo que los convierte en una prometedora opción terapéutica para acelerar *in vivo* la regeneración del tejido muscular lesionado (Menetrey et al. 2000).

Las inyecciones intramusculares de IGFI, FGF-básico (bFGF) y, en menor grado, del factor de crecimiento nervioso (*Nerve Growth Factor*, NGF), han demostrado mejorar la regeneración del músculo esquelético en distintos modelos de lesión muscular de ratón (Menetrey et al. 2000; Kasemkijwattana et al. 2000). Sin embargo, la eficacia de este tipo de tratamiento está limitada por la alta concentración que se requiere del factor. Esto se debe principalmente a la rápida eliminación de estas moléculas por el torrente sanguíneo y a su corta vida biológica.

Por otro lado, se están desarrollando diferentes estrategias experimentales donde se neutraliza la expresión de TGF- β 1, con el fin de inhibir la formación de fibrosis en el músculo esquelético que se está regenerando. Algunos ejemplos de estos agentes anti-fibróticos pueden ser la decorina, el interferón gamma y la suramina (Fukushima et al. 2001; Foster et al. 2003; Y.-S. Chan et al. 2005).

1.6.2.1. PRP

En los últimos años, el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) ha aumentado la atención científica y mediática por su potencial en la mejora de la regeneración de lesiones musculoesqueléticas y ha sido considerado un tratamiento prometedor para la medicina deportiva (Foster et al. 2009; Creaney & Hamilton 2008; Sánchez et al. 2009).

El PRP es una fracción de plasma sanguíneo enriquecido en plaquetas, posee una concentración superior a la basal y es obtenida mediante diversas centrifugaciones (Marx 2001). Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos pequeños, irregulares y carentes de núcleo, que contienen en su interior numerosos factores de crecimiento que tiene la capacidad de estimular diferentes procesos de la regeneración tisular. La fracción de PRP puede llegar a estar formada por más de 30 componentes bioactivos, entre los cuales están al menos 7 de los principales factores de crecimiento, como PDGF, bFGF, VEGF, IGF-1 y TGF- β ; capaces de promover la curación de diversos tejidos (Mishra 2010; Eppley et al. 2004). El PRP no sólo está compuesto por citoquinas consideradas beneficiosas, sino que también contiene niveles significativos de otras micropartículas (Zimmerman & Weyrich 2010) y especies de oxígeno reactivo (Hooiveld et al. 2003) que pueden ser perjudiciales para la reparación de tejidos. Debido a su compleja composición, su efecto puede variar también, en función del tejido con el que interactúe (Eppley et al. 2004; Marx 2004).

A pesar de que sus mecanismos de acción son todavía en gran parte desconocidos (Andía et al. 2011; K. S. Lee et al. 2011; Mishra et al. 2012), se ha demostrado que el PRP incrementa la proliferación, la motilidad celular y algunos aspectos de la miogénesis *in vitro* (Andía & Abate 2015). Ha confirmado además, que es capaz de activar, modular, acelerar y mejorar el proceso de reparación tisular *in vivo* (Andía & Abate 2015; Denapoli et al. 2016) (Tabla 4).

Author	Methods/design	PRP	Outcome	Main results
<i>In vitro</i>				
Mazzocca et al. (2012) [12]	Primary cultures of human myocytes	PRP low platelet count, PRP moderate platelet and leukocyte count, and PRP high platelet and low leukocyte count	Proliferation PRP versus FBS and versus native blood	PRP (LP) enhanced proliferation versus blood. PRP (HP) or PRP (DS) no effect in proliferation compared with controls
McClure et al. (2013) [13]	C2C12 myoblasts	PRP and PRP embedded in electrospun aligned polydioxanone and polycaprolactone fibers	Myogenic markers, early differentiation marker MyoD 7 days	PRP influence proliferation and differentiation
Ranzato et al. (2009) [14]	Scratch wound in C2C12 myoblasts	Plateletlysate	Proliferation, cytotoxicity, motility	PL enhanced proliferation and motility; p38 and PI3K inhibitor decreased the PL effect but ERK inhibitor did not
<i>In vitro and in vivo</i>				
Li et al. (2013) [15]	In vitro hMDPCsmyoendothelial cells, and pericytes In vivo, transplantation in mdx-SCID mice in the gastrocnemius injured with cardiotoxin	L-PRP, 2×10^6 plts/uL Approximately 10 Thrombin-activated PRP releasate	Proliferation, flow cutometry multi differentiation potential	PRP maintained stemness; retained ability to regenerate myofibers in vivo, maintained differentiation potential (osteogenic, chondrogenic, adipogenic); proliferation decreased when blocking PDGF
Talaie et al. (2015) [16]	PRP incubation with SPION and visualization of platelets in vitro Injection in tibialis anterior muscles in Sprague-Dawley rats	Delivery of PRP via superparamagnetic nanoparticles	MRI to track platelet position	Platelets can be maintained in the desired location by application of a magnetic field
<i>In vivo</i>				
Borrione et al. (2013) [17]	Wistar male adult rats (n = 102) surgical lesions flexor sublimis muscles	Pure PRP applied immediately after injury Platelets > 4 x baseline CaCl2 activation	Immunohistochemistry, morpho-quantitative stereological analysis, and western blot assay	Leukocyte infiltrate with increased expression of CD3, CD8, CD19 and CD68 and to decreased CD4 antigen. No changes in blood vessel density and blood vessel diameter
Cunha et al. (2014) [18]	Male Wistar rats, surgical lesions, n = 20 in 4 groups sedentary sham, sedentary PRP, trained sham, trained PRP	40 - 60 µl PRP approximately 106 plts/µl, 1Uthrombin/ml+30 µl CaCl2	Serum lactate levels and collagen fiber concentration	Reduced collagen 1 but increased type 3 collagen fibers in trained PRP-treated rats. Exercise in association with PRP enhances the skeletal musclehealing process
Delos et al. (2014) [19]	Forty-six male Lewis rats, 11 -- 12 rats/group, single blunt impact to the gastrocnemius muscle via a drop-mass technique	100 µl PRP: plts, $2.19 \times 10^6 (\pm 2.69 \times 10^5)$ /µl. Leukocytes 22.54×10^3 /µl Single injection but different injection times, immediately, days 1 and 3	maximal isometric torque strength, percentage of centronucleated fibers days 0, 1, 4, 7, 10 and 14	No differences at any follow-up time, No differences between the timing of PRP injection

Author	Methods/design	PRP	Outcome	Main results
Dimauro et al. (2014) [20]	Wistar rats, Right flexor sublimis muscle; mechanical injury	Pure PRP, platelet conc 4 x 100 µl CaCL2 activated	Days 2, 5 Inflammatory and myogenic molecular changes	Increased IL-1b, and TGF-b1, myogenic regulatory factors such as MyoD1, Myf5 and Pax7, and IGF-1Eb.
Gigante et al. (2012) [21]	Surgical lesions Longissimus dorsi muscle Wistar rats	PRFM (1 - 1.5 x) versus sham	Histology, histomorphometry, immunohistochemistry 5, 10, 40 and 60 days	Muscle regeneration (improved), neovascularization (increased), fibrosis (less than controls), inflammation (no differences)
Hammond et al. (2009) [22]	Sprague-Dawley rats (n = 72), tibialis anterior muscle isometric contractions: 1) large strain (single contraction) and 2) small strains (multiple repetitions)	Sonicated L-PRP, 100 µl injection at days 0, 3, 5 and 7	Maximal isometric torque before injury, 4 min after injury Changes in MyoD and myogenin proteins (RT-PCR and Western blot). Quantification of centrally nucleated fibers	Differences with controls were more evident in the small strain group. In this group, PRP improved contractile function at 7 and 14 days, shortening time to full recovery from 21 to 14 days. MyoD and myogenin transcripts elevated in PRP treated on day 7. The number of regenerating fibers peaked at 2 weeks and was higher in the small strain group than in controls
Harris et al. (2012) [23]	Rabbits (n = 18) Injections, 0.5 ml PRP in healthy right or left quadriceps, Saline injections in the contralateral site	Liquid PRP (not described)	Histology, 2, 6 and 12 weeks	Persistent, but diminished inflammatory infiltrate, mainly composed of lymphocytes and monocytes
Terada et al. (2013) [24]	87 female mice, 19 mice/ group; control, losartan, PRP, losartan + PRP tibialis anterior muscle contusion	Pooled PRP from 20 mice, plts 5.5 x TGF-b1 3998.5 ng/ml; platelet-poor plasma 242,1 ng/m	Area of fibrotic scar Muscle strength, angiogenesis, immunohistochemistry (pSmad2/ 3 positive areas)	PRP enhanced angiogenesis 1 and 2 weeks after injury. Follistatin expression increased after 2 weeks in PRP + losartan; less prevalent Smad2/3 areas in PRP
WrightCarpenter et al. (2004) [25]	Contusion injury to their gastrocnemius muscle	Local injections of autologous conditioned serum at 2, 24 and 48 h after injury	Histology 1 week	Satellite cell activation at 30/ 48 h post injury was accelerated and the diameter of the regenerating myofibers was increased compared to the controls within the first week after injury

Tabla 4. Investigación experimental: Estudios in vivo e in vitro. DS, doble spin; HP, alto en plaquetas; LP, bajo en plaquetas; PRP, plasma rico en plaquetas; L-PRP, PRP con leucocitos; PL, plaquetas lisadas; PDGF, factores de crecimiento derivados de plaquetas. *Tabla adaptada de (Andia & Abate 2015).*

Así mismo, el PRP estimula la proliferación de fibroblastos y potencia la síntesis de colágeno debido a su alta concentración en TGF- β 1, pudiendo inducir fibrosis muscular. Sin embargo, las acciones de los PRPs en torno al desarrollo de la fibrosis, son paradójicas, ya que también contienen moléculas anti-fibróticas. De hecho, el HGF y la proteína amiloide sérica, inhiben la fibrosis en diferentes modelos, mediada en parte por los macrófagos (Sugiura T1, Kawaguchi Y, Soejima M, Katsumata Y, Gono T, Baba S, Kawamoto M, Murakawa Y, Yamanaka H 2010). Los factores de crecimiento liberados por las plaquetas pueden influir en la reinervación del tejido lesionado, por sí solos o en sinergia, dependiendo de su concentración. De hecho, aunque éstos no se clasifiquen como neurotróficos, tienen un papel en la migración de células de Schwann y su proliferación, en el metabolismo neuronal, en la síntesis de factores neurotróficos, en la formación de la matriz y en la mielinización y regeneración del axón (Farrag et al. 2007; Sariguney et al. 2008; Sánchez et al. 2014; Park & Kwon 2014).

Algunas de las claves de su generalizada aplicación en el tratamiento de lesiones musculares, radican en su procedimiento de obtención simple, eficiente y mínimamente invasivo. Sin embargo, los resultados actuales siguen siendo controvertidos (Moraes et al. 2014; Reider 2016). Se han registrado numerosas variaciones en la composición de PRP, debido en parte a las diferencias encontradas en los protocolos de preparación, en el uso de anticoagulantes, de activadores plaquetarios o en la presencia de leucocitos (Weibrich et al. 2002; Dohan Ehrenfest et al. 2009; Lei et al. 2009; Mazzucco et al. 2009). Así mismo, el protocolo de administración también varía, pudiendo repercutir en la efectividad del tratamiento, acogiendo aspectos como la definición del número de aplicaciones, el intervalo entre éstas y el modo de administración. En la figura 11 se resumen al menos tres de las fuentes más importantes de variabilidad, que debido a la falta de estandarización, tanto en la preparación como en su aplicación, podrían explicar esta discrepancia de resultados (Dohan Ehrenfest et al. 2009; Mazzucco et al. 2009).

SOURCES OF VARIABILITY IN PRP THERAPIES

The product

- Platelet count
- Leukocyte count
- Exogenous activation
- pH (buffering)

• Volume

- Platelet and leukocyte dosage
- Ratio platelet/plasma factors

The host tissue

- Timing of injection
- Anatomical location
- The grade of injury

The procedure

- Injection technique
- Number of injections
- Interval between injections



Figura 11. Fuentes de variabilidad en las terapias de PRP: composición de los productos del PRP, dosificación de plaquetas y leucocitos y diferentes características del tejido huésped. *Figura extraída de (Andia & Abate 2015).*

La investigación sobre la eficiencia clínica del tratamiento con PRP, aún está en sus comienzos; existiendo en la actualidad una falta de evidencia sólida que apoye su uso (Kon et al. 2011). Esta escasez de ECA en lesiones musculares es atribuible al hecho de que este tratamiento ha estado prohibido por la Agencia mundial antidopaje (*World Anti-Doping Agency, WADA*) (Engebretsen et al. 2010) hasta el 2011; debido a la sospecha de que el PRP podría mejorar el rendimiento atlético en base a su contenido en factores ergogénicos incluidos en la lista de la WADA, como, IGF-1, IGF-BP3, la hormona de crecimiento, VEGF, PDGF-BB, bFGF y HGF. Se ha estudiado por tanto, la posibilidad de que el PRP pueda alterar los niveles sistémicos de estas sustancias (Aoto et al. 2014; Schippinger et al. 2012; Schippinger et al. 2011); sin embargo no se encontraron modificados los niveles circulantes de estos factores tras la aplicación de PRP por vía intramuscular (Schippinger et al. 2012; Schippinger et al. 2011).

Aunque existe una gran cantidad de datos preclínicos que apoyan el uso de PRP, los resultados obtenidos hasta el momento en los ECA, se consideran todavía preliminares. Esto se debe, en parte, al tamaño de las muestras de estudio, que tiende a ser demasiado pequeño para permitir una generalización en los hallazgos adquiridos. (A Hamid et al. 2014; Andia & Abate 2015; Pas et al. 2015; Rodeo 2016; Sánchez et al. 2009) (Tabla 5).

Author	Design/patients	PRP	Outcome	Main results
Systemic effects of PRP (laboratory studies)				
Aoto et al. (2014) [63]	No intervention, only PRP analyses Ten adult young male 30.0 ± 2.6 years Cellular and molecular analysis of PRP 4 times per day (7 AM, 11 AM, 3 PM, and 7 PM)	20-ml sample of fasting blood, Pure PRP moderate platelet enrichment	Differences in cellular composition, and PDGF-BB and TGF-b1	No differences in platelet, white blood cell and red blood cell counts in the PB or in the PRP samples throughout the course of the day. In addition, there were no significant differences in PRP growth factor levels at the various time points
Schippinger et al. (2012) [64]	2.5 ml intramuscular PRP injection Ten adult young male 23.0 ± 1.5 years	Pure PRP moderate platelet enrichment, ACP Arthrex	Systemic changes in IGF-1, PDGF-AB, PDGF-BB, TGF-b1, TGF-b2, VEGF, endothelial growth factor and fibroblastic growth factor after 3 and 24 h	Increase in TGF-b2 after 24 h No differences in the other GFs
Schippinger et al. (2011) [65]	2.5 ml intramuscular PRP injection Ten adult young male 23.0 ± 1.5 years	Pure PRP moderate platelet enrichment, ACP Arthrex	IGF-1, 0.5, 3 and 24 h	No differences at any time point
Clinical studies (Efficacy/Safety)				
A Hammid et al. (2014) [66]	RCT/28 patients, acute hamstring injury grade, PRP + rehabilitation versus rehabilitation	Single L-PRP injection $5.54 \times (500 \times 10^6 \text{plt/ml})$; 38×10^6 leukocytes/ml PRP Type 1A, 5.5 x (Mishra et al. 2012) P4A (PAW, De Long et al. 2012)	Return to competition Changes in pain severity and intensity	PRP: 26.7 ± 7 days CTRL: 42.5 ± 20.6 days, $p = 0.02$ lower pain severity and intensity in the PRP group
Reurink et al. (2014) [67]	RCT/80 patients, acute hamstring injury PRP + rehabilitation versus placebo injection + rehabilitation First injection within 5 days of the injury	2 Pure PRP injections, ACP, interval 5 - 7 days 2 - 3 x ($500 \times 10^6 \text{plt/ml}$) PRP Type 4B (Mishra et al. 2012) P2-x-Bb (PAW, De Long et al. 2012)	Return to competition Re-injury rate	PRP: 42 days (37 - 56) placebo: 42 days (30 - 58) reinjury : 16% PRP group, 14% placebo
Bubnov et al. (2013) [68]	30 athletes (34 injuries), cohort study, (thigh, shoulder, foot and ankle) PRP + conservative treatment (immobilization, general physiotherapy, antiinflammatories) versus conservative treatment	2 ml L-PRP (buffy coat)	7, 14, 21, 28 days pain and range of motion Return to competition	Improved range of motion at 28 days Pain relief in the first 24h: 28% in PRP group, 10% in control group Return to competition: PRP: 10 ± 1.2 days Control: 22 ± 1.5 days
WrightCarpenter et al. (2004) [69]	Prospective experimental group and retrospective controls, professional athletes ACS group n = 16 Control group: Actovegin/traumeel n = 11	ACS injection (2.5 ml ACS + 2.5 ml saline) (anesthetics 5 ml Meaverin 0.5%). Repeated injections every 2 days until recovery. Mean number ACS injections: 5.4	Time to resume competition, MRI	16.6 ± 0.9 days in the ACS treated versus 22.3 ± 1.2 (mean \pm SEM) days in the Actovegin/Traumeel control group ($p = 0.001$). MRI analysis supported the observed acceleration of the lesion recovery time

Author	Design/patients	PRP	Outcome	Main results
Clinical studies (Efficacy/Safety)				
Bernuzzi et al. (2014) [70]	53 athletes (36 men, 17 women), case series Grade 2 lesions, ultrasound guided injections, PRP + rehabilitation	3 injections 7 days interval. Frozen PRP (0.96 - 1.3 x 10 ⁶ plts/ μ l), activated before injection 5 ml PRP + 1 ml CaCl ₂ * 1 ml autologous thrombin and CaCl ₂	Pain reduction, muscle function recovery and return to sports activity, ultrasound-imaging tissue healing, relapses, local infections	Significant reduction in pain 7 days after treatment. Mean time to rehab 20 days (16 - 28) Return to sport activities 30 + 1.2 (28 - 35) 1 patient relapse after 1 year
Rettig et al. (2013) [71]	Retrospective casecontrol 10 professional athletes, five per group Acute hamstring Grade 1 - 2 injuries	L-PRP + rehabilitation GPS-III, buffered PRP: NaHCO ₃ , 2:1 6 ml L-PRP within 48 h after injury	Time to return to play	Median time to return to play 20 days (16 -- 30) in PRP group and 17 days in the control group (8 -- 81) No scarring, pain, bruising or complications after 6 months

Tabla 5. Estudios en humanos. ACP, plasma autólogo condicionado; ACS, suero autólogo condicionado; CTRL, control; GPS, sistema de separación de plaquetas gravitacional; PRP, plasma rico en plaquetas; L-PRP, PRP con leucocitos; PL, plaquetas lisadas; PDGF, factores de crecimiento derivados de plaquetas; SEM, error estándar de la media. *Tabla adaptada de (Andia & Abate 2015).*

Sin embargo, el tratamiento con PRP ha fallado recientemente en dos ECA controlados con placebo realizados en atletas con lesiones agudas musculoesqueléticas (Hamilton et al. 2015; Reurink et al. 2015). Los productos de PRP utilizados se obtuvieron a través de sistemas de purificación de PRP comerciales, que permiten separar y purificar la fracción de interés a partir de sangre total. Estos sistemas proporcionan un aumento entre 2 y 3 veces el número de plaquetas y generan un PRP rico en plaquetas y pobre en leucocitos, aunque cabe destacar que las técnicas de inyección y el contenido de PRP difieren ligeramente en ambos ensayos (Hamilton et al. 2015; Reurink et al. 2015).

Mientras que Reurink y colaboradores (Reurink et al. 2015) utilizaron salino como placebo, Hamilton y colaboradores (Hamilton et al. 2015), compararon el PRP con inyecciones de plasma pobre en plaquetas (*Platelet-Poor Plasma*, PPP). Dado que los supuestos beneficios del PRP radican en las elevadas concentraciones de factores de crecimiento, el PPP fue elegido como placebo en este estudio por su reducida concentración de plaquetas y factores de crecimiento en comparación con el PRP. A pesar de esto, existe poca experiencia con el PPP y debido a su composición (pH, osmolaridad y concentración de leucocitos y plaquetas), no se pueden excluir los

efectos miotóxicos; por lo que su efecto permanece incierto. Por tanto, la solución salina se considera un placebo más válido, ya que se disponen de amplias pruebas de su inocuidad en el tejido muscular (Reurink et al. 2014).

Así mismo, se identificó una pequeña diferencia en el *return-to-play* entre los grupos citados, donde la inyección de PRP dio lugar a una reducción en el tiempo de espera en comparación con el PPP, sugiriendo una distinción fisiológica entre los dos inyectados. Por el contrario, no se observaron diferencias en las tasas de *re-injury* entre el PRP y los grupos PPP (Hamilton et al. 2015). Cabe destacar que, a los atletas lesionados participantes en ambos ECA se les añadieron estrictos protocolos de rehabilitación post-inyección.

1.6.3. Terapia con glicosaminoglicanos

El deterioro de la homeostasis biológica y mecánica es común en la medicina deportiva ortopédica, donde los tejidos músculo-esqueléticos, como ya se ha descrito, son susceptibles a múltiples lesiones; pudiendo desencadenar problemas crónicos como la osteoartritis (OA) (Takeda et al. 2011).

El CS y la glucosamina (GLU), un aminomonosacárido endógeno sintetizado a partir de glucosa y utilizado para la biosíntesis de glicoproteínas y glicosaminoglicanos (Dahmer & Schiller 2008), son compuestos naturales de origen biológico. Ambos están presentes en la ECM que rodea las células, especialmente en tejidos como el cartílago, la piel, los vasos sanguíneos, los ligamentos, los tendones y el cerebro, donde son un componente esencial de los PGs (du Souich 2014).

Se han realizado múltiples ECA en pacientes con OA, en los cuales se muestran los beneficios clínicos de la aplicación de CS y GLU como terapia, tanto en la reducción del dolor, la hinchazón de las articulaciones y el derrame, como en la mejora de la función de las articulaciones y el retraso de la progresión de la enfermedad, con un excelente perfil de seguridad (Zeng et al. 2015). Por consiguiente, CS y GLU se han clasificado como fármacos de acción sintomática lenta para la osteoartritis (*Slow Acting Drugs for Osteoarthritis*, SYSADOA), pudiendo influir en el curso de la

artrosis (frenando o retrasando la enfermedad), es decir, actuando como modificadores del curso de la enfermedad artrósica o S/DMOAD (*Structure/disease-modifying anti-osteoarthritis drug*).

Así mismo, la eficacia de la combinación CS y GLU en el tratamiento de la OA de rodilla, ha sido probada en diferentes estudios clínicos. El estudio GAIT (*The Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial*) sugirió que la combinación de GLU y CS podría ser eficaz en pacientes con un dolor de rodilla de moderado a severo (Clegg et al. 2006). Estos prometedores resultados fueron confirmados por Hochberg y colaboradores en el estudio MOVES (*Multicentric Osteoarthritis Intervention Study*) con SYSADOA (Hochberg et al. 2016).

Los mecanismos de acción de ambos productos han sido ampliamente estudiados (du Souich 2014). CS y GLU poseen efectos inmunomoduladores tales como la reducción de la translocación nuclear del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y la disminución en la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β . Por otra parte, los efectos anti-inflamatorios y de anti-reabsorción de la combinación de CS y GLU también se han estudiado ampliamente en varios estudios *in vitro*. Chan y colaboradores, demostraron que en los explantes de cartilago bovino, la combinación de CS con clorhidrato de GLU fue ligeramente mejor que la administración únicamente de GLU para la inhibición tanto catabólica como inflamatoria (P. S. Chan et al. 2005; Chan et al. 2006).

Hasta el momento, la formulación combinada de CS y GLU no ha sido testada como posible tratamiento en lesiones del tejido muscular, por lo que se desconocen sus efectos, así como el mecanismo de acción de los factores implicados en la regeneración muscular.

Sin embargo, Chevalier y colaboradores (Chevalier et al. 2015), evaluaron el efecto en los cambios de estructura y bioactividad de los GAG endógenos, especialmente del HS y el CS en el músculo extensor largo de los dedos (EDL) de rata después de inducir isquemia. Así mismo, desarrollaron una familia de polímeros modificados químicamente que pudieran imitar la estructura de los GAG naturales (Papy-García, 2005). Estos compuestos reemplazan funcionalmente a los GAG endógenos después

de la lesión tisular, ya que son resistentes a la degradación de la glicanasa y, por tanto, mejoran la protección y la función de las proteínas de unión a la heparina (*Heparin-binding proteins*, HBPs) durante la remodelación de la matriz (Meddahi et al., 2002). Tras la administración de estos GAG biosintéticos, se observaron cambios estructurales importantes que se asocian a las capacidades de los GAG para unirse a factores de crecimiento y modular la actividad celular, demostrando la relevancia de este tratamiento en la aceleración de la reparación muscular.

Otro estudio, demostró que los GAG, son potentes estimuladores de la reinervación muscular y que sus efectos pueden estar mediados por un aumento de los niveles de IGF-1. Estos resultados se obtuvieron a través de la suplementación con GAG (en cuya composición incluye CS), tras una lesión neonatal del nervio ciático en modelo de rata; en el cual se promovió la reinervación del músculo extensor lardo de los dedos con la consecuente mejora de la morfología muscular (Gorio et al. 1998).

Por otro lado, se han estudiado *in vivo* los efectos de la administración de los PGs biglicano (Ito M. 2016) y decorina (Hwang 2006), en ratón *mdx* y en un modelo de lesión muscular por laceración en ratas, respectivamente. En el caso de la terapia con biglicano, se observó un aumento de la expresión de utrofina, una mejora de los déficits motores y una disminución en los niveles de creatina quinasa en sangre. Así mismo, el número de mionucleos centrales y la distribución del tamaño de las miofibras aumentaron en la histología de las secciones musculares de los animales tratados (Ito M. 2016). El tratamiento basado en el PG decorina, generó un incremento de fuerza muscular, un aumento en el número de nuevas miofibras y una disminución en los niveles de fibrosis (Hwang 2006). Por lo que la aplicación de ambos tratamientos, promovió la regeneración muscular de los animales tratados.

2. OBJETIVOS

1-Generar un nuevo modelo *in vivo* de lesión muscular inducida quirúrgicamente en ratas, fácilmente reproducible y que imite las lesiones más frecuentes del músculo esquelético observadas en la clínica deportiva humana, con el fin de profundizar en el estudio de la regeneración y evolución de lesiones músculo-tendinosas.

2-Realizar un estudio temporal de la lesión muscular en el nuevo modelo animal a través de estudios fisiológicos de fuerza muscular, la evaluación histológica e inmunohistoquímica y la evaluación mediante técnicas de imagen como la resonancia magnética, así como comparar las similitudes de la lesión muscular generada en el modelo de rata con las lesiones observadas en clínica deportiva de élite.

3-Desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en el ejercicio físico y la administración de plasma rico en plaquetas (PRP) mediante una única inyección intramuscular guiada por ecografía, tanto por separado como en combinación, con el objetivo de mejorar la regeneración muscular y prevenir la fibrosis en el modelo de lesión muscular en rata.

4-Evaluar el potencial efecto terapéutico de la administración de PRP y ejercicio, por separado o en combinación, en modelo de lesión muscular en rata, a través del estudio de la funcionalidad del músculo esquelético mediante estudios fisiológicos de incremento de fuerza tetania muscular, y mediante la evaluación histológica e inmunohistoquímica de marcadores específicos de regeneración muscular y fibrosis con el fin de determinar la mejora en el proceso regenerativo.

5-Estudio del efecto terapéutico en la regeneración muscular del tratamiento basado en la administración de la combinación de Condroitín Sulfato y Glucosamina, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal, en el nuevo modelo de lesión muscular quirúrgica en ratas.

6. Análisis de la mejora funcional del músculo mediante evaluación de fuerza tetania muscular y mediante la evaluación histológica e inmunohistoquímica de marcadores específicos para determinar la efectividad de los tratamientos en el aumento de los niveles intramusculares de Condroitín Sulfato y su efecto estimulador de la regeneración muscular y prevención de fibrosis en el proceso regenerativo muscular.

3. INFORME DEL DIRECTOR

El doctor Mario Marotta Baleriola y el doctor Gil Rodas Font, como directores de la Tesis Doctoral presentada por Paola Contreras Muñoz, hacen constar que la doctoranda ha participado activamente en los artículos que forman esta memoria, tal como queda reflejado en el orden y composición del equipo de autores de cada uno de ellos. La doctoranda ha tenido un papel fundamental en la realización del trabajo experimental, el tratamiento de los datos y en la obtención de los resultados derivados de la presente tesis doctoral. También ha tenido un importante papel en el proceso de difusión y publicación de los resultados y conclusiones, es decir, en la redacción de los manuscritos y en el proceso de revisión por pares.

Los factores de impacto de las revistas donde se han publicado, aceptado y enviado los artículos que conforman esta tesis son los siguientes:

Artículo I

Título de la publicación: A New Surgical Model of Skeletal Muscle Injuries in Rats Reproduces Human Sports Lesions.

Autores: Contreras-Muñoz P., Fernández-Martín A., Torrella R., Serres X., De la Varga M., Viscor G., Järvinen T. A. H., Martínez-Ibáñez V., Peiró J. L., Rodas G., Marotta M.

Revista: International Journal of Sport Medicine

Año: 2016

Volumen: 37

Páginas: 183-190

DOI: 10.1055/s-0035-1555933

Impact Factor (2015): 2,528

Artículo II

Título de la publicación: Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combined

Autores: Contreras-Muñoz P., Torrella JR., Serres X., Rizo-Roca D., De la Varga M., Viscor G., Martínez-Ibáñez V., Peiró J. L., Järvinen T. A. H., Rodas G., Marotta M.

Revista: The American Journal of Sports Medicine

Año: 2017

DOI: 10.1177/0363546517702864

Impact Factor (2016): 4,517

Artículo III

Título de la publicación: Chondroitin sulfate and glucosamine administration improves muscle regeneration in rats: a new potential treatment for sports medicine?

Autores: Contreras-Muñoz P., Montell E., Torrent A., Torrella JR., De la Varga M., Viscor G., Vergés J., Rodas G., Marotta M.

Revista: Enviado a International Journal of Sports Medicine Journal y actualmente en revisión.

4. PUBLICACIONES

Artículo I

A New Surgical Model of Skeletal Muscle Injuries in Rats Reproduces Human Sports Lesions. Contreras-Muñoz P.^{1,2}, Fernández-Martín A.², Torrella R.³, Serres X.⁴, De la Varga M.¹, Viscor G.³, Järvinen T. A. H.^{5, 6}, Martínez-Ibáñez V.², Peiró J. L.^{2, 7}, Rodas G.^{1, 8}, Marotta M.¹ ²International Journal of Sport Medicine. 2016. 37:183–190

DOI: 10.1055/s-0035-1555933

1 Leitat Foundation, Leitat Technological Center, Carrer de la Innovació 2, Terrassa, Barcelona, Spain.

2 Bioengineering, Orthopedics and Pediatric Surgery Laboratory, Vall d’Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

3 Physiology Department, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

4 Ultrasound Unit, Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

5 School of Medicine, University of Tampere, Tampere, Finland.

6 Department of Orthopedics & Traumatology, Tampere University Hospital, Tampere, Finland.

7 Translational Research in Fetal Surgery for Congenital Malformations Laboratory, Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy, Cincinnati Children’s Hospital Medical Center (CCHMC), Cincinnati, Ohio, USA.

8 Medical Services, Futbol Club Barcelona, Ciutat Esportiva Futbol Club Barcelona, Barcelona, Spain.

A New Surgical Model of Skeletal Muscle Injuries in Rats Reproduces Human Sports Lesions

Authors

P. Contreras-Muñoz^{1,2}, A. Fernández-Martín², R. Torrella³, X. Serres⁴, M. De la Varga¹, G. Viscor³, T. A. H. Järvinen^{5,6}, V. Martínez-Ibáñez², J. L. Peiró^{2,7}, G. Rodas^{1,8}, M. Marotta^{1,2}

Affiliations

Affiliation addresses are listed at the end of the article

Key words

- skeletal muscle injury
- rat model
- surgical injury
- automatic biopsy needle
- human sports lesions

Abstract

Skeletal muscle injuries are the most common sports-related injuries in sports medicine. In this work, we have generated a new surgically-induced skeletal muscle injury in rats, by using a biopsy needle, which could be easily reproduced and highly mimics skeletal muscle lesions detected in human athletes. By means of histology, immunofluorescence and MRI imaging, we corroborated that our model reproduced the necrosis, inflammation and regeneration processes observed in dystrophic mdx-mice, a model of spontaneous muscle injury, and realistically mimicked the muscle lesions observed in professional athletes. Surgically-injured rat skeletal muscles demonstrated the longitudinal process

of muscle regeneration and fibrogenesis as stated by Myosin Heavy Chain developmental (MHcD) and collagen-I protein expression. MRI imaging analysis demonstrated that our muscle injury model reproduces the grade I-II type lesions detected in professional soccer players, including edema around the central tendon and the typically high signal feather shape along muscle fibers. A significant reduction of 30% in maximum tetanus force was also registered after 2 weeks of muscle injury. This new model represents an excellent approach to the study of the mechanisms of muscle injury and repair, and could open new avenues for developing innovative therapeutic approaches to skeletal muscle regeneration in sports medicine.

Introduction

Skeletal muscle injuries are the most common sports-related injuries (their frequency varying from 10–55% of all sustained injuries) and a major concern in sports medicine [2, 19]. According to the World Health Organization (WHO), musculoskeletal injuries are the most common cause of severe long-term pain and physical disability, and affect hundreds of millions of people worldwide [38]. Loss or abnormality of bodily structure or functioning resulting from an isolated exposure to physical energy during sports training or competition are normally diagnosed by a clinical professional as a medically recognized injury [33].

In human sport clinics, the diagnosis of muscle injury is adequate in most cases, but imaging modalities such as ultrasonography, computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) are important to differentiate between structural lesions and functional disorders and to determine the extent of the injury although

small and deep hematomas localized within the muscle belly could be more difficult to diagnose clinically [1, 23, 32]. Ultrasonography can be considered a valid first-line tool, if a more exact characterization of the injury is desired. MRI, in turn, should be preferred if a clear discrepancy exists between the patient's symptoms, the physician's findings and/or the ultrasonography and, in particular, in injuries close to the muscle-tendon junction [1, 32], where MRI has shown its superiority over ultrasonography [18]. MRI can accurately confirm or rule out the existence of muscle injury and also provides a very detailed characterization of the muscle lesion [18]. At present, there is much controversy in the classification of skeletal muscle injuries, which sometimes causes limitations to the comprehensive study of muscle injuries and discrepancies in the uniformity for their categorization and description [10]. Based in the last classification proposed by Pollock et al. [27], skeletal muscle lesions could be classified in 4 grades depending on MRI imaging: a) Grade I: These are small injuries of the

accepted after revision
June 18, 2015

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1555933>
Published online:
December 15, 2015
Int J Sports Med 2016; 37:
183–190 © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York
ISSN 0172-4622

Correspondence

Dr. Mario Marotta
Leitat Foundation
MuscleTech Network
C/Innovació nº 2
08225 Terrassa (Barcelona)
Spain
Tel.: +34 93 4893000
Ext.: 3789
Fax: +34 93 4893893
mmarotta@fundacionleitat.org

muscle characterized by high signal change (edema in T2), which is evident at this site and extends over a limited area of less than 5 cm and less than 10% of the muscle cross-sectional area at its maximal site; b) Grade II: These types of injuries are moderate injuries of the muscle. Under MRI imaging, the high signal change will either measure between 10 and 50% of the cross-sectional area of that individual muscle at the site of injury or extend between 5 and 15 cm within the muscle. Architectural fiber disruption is commonly less than 5 cm; c) Grade III: These injuries are extensive injuries of the muscle. MRI features of high signal change patterns of greater than 50% of the muscle cross-sectional area or greater than 15 cm in length. It is evidenced that the architectural muscle fiber disruption which is likely to be greater than 5 cm; d) Grade IV: These are the most severe injuries and are characterized by a complete tear of either the muscle or tendon.

Skeletal muscle lesions are often caused by eccentric contraction that forcibly lengthens an activated muscle. When unaccustomed or intense, this active stretching of the muscle-tendon unit can produce exercise-induced muscle injury [7]. Clinical data reveal a high recurrence rate (nearly 30%) of skeletal muscle strain injuries among professional athletes [37], and a main concern in professional athletes is the faster recovery after trauma [4]. The consequences of failed treatment can be very dramatic, possibly postponing an athlete's return to play for weeks or even months. Thus the recognition of some basic principles of skeletal muscle regeneration and healing processes can considerably help in both avoiding the imminent dangers and accelerating the return to competition [17].

Adult skeletal muscle has the ability to self-repair in response to injury [6, 13] and commonly the muscle tissue is damaged and repaired repeatedly throughout life, especially in sportsmen. The natural history of muscle injury proceeds through a highly coordinated sequence of steps. Muscle regeneration is a highly coordinated process that requires the utilization of undifferentiated cells, called satellite cells (or myogenic progenitor cells) located between the basal lamina and the sarcolemma of mature muscle fibers [3, 9, 13, 31]. Satellite cell population is a residual pool of self-renewing progenitor cells, capable of supporting additional rounds of regeneration and to reestablish the initial quiescent satellite cell's pool after every muscle injury episode [8]. When activated by muscle damage, they can proliferate producing a large number of myoblasts that can repair skeletal muscle injury and generate a large number of new myofibers within just a few days [36]. Myoblasts can fuse and differentiate into multinucleated fibers recapitulating the events of embryonic muscle development and finally restoring the skeletal muscle architecture [6, 13, 25, 28, 31]. The complex muscle repair process is dependent on an orchestrated response between the inductive signals of cytokines and growth factors, which are released by the injured fibers, invading macrophages and inflammatory cells or connective tissue [6, 9]. Simultaneously, increased expression of angiogenic factors and markers of new capillaries, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-1/2 and α -smooth muscle actin (α -SMA), could be detected along with the formation of new myofibers ensuring the maintenance of blood supply to regenerated muscle [30, 35]. The repair of skeletal muscle follows a set pattern, which can be divided into 3 phases [15, 16, 18, 19, 21]: 1) Destruction phase, characterized by the rupture of the membrane of muscle fibers and the subsequent necrosis and inflammatory cell reaction; 2) Repair phase, characterized by the phagocytosis of the necrotic

muscle fibers by blood derived monocytes, satellite cells activation, generation of new muscle fibers and the production of a tissue scar; 3) Remodeling phase, characterized by the reorganization of the muscle fibers, the remodeling of the scar tissue, and the restoration of muscle function and maturation of the regenerating myofibers including the formation of a mature contractile apparatus. Even though in the last 25 years extensive research has been directed towards the elucidation of the process of skeletal muscle regeneration, its complex regulatory pathways still remain poorly understood [22].

In this study, we present a new *in vivo* model of surgically-induced lesions that could mimic the most frequent skeletal muscle lesions observed in the human sports clinics. Hence, in the present work our aim was to generate a new surgically-induced skeletal muscle injury model in rats that could be easily reproduced and that mimicked the skeletal muscle lesions observed in human elite athletes and sportsmen which could open new avenues for future studies of innovative therapeutic approaches to skeletal muscle regeneration and sports medicine.

Materials and Methods



Animals

Adult (8-week-old) male Wistar rats (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) were used as animal model. The total number of animals used in our study was 63. Rats were housed at 22–24°C and maintained on a 12-h light/dark cycle. Water and food were given *ad libitum* during the experiments. All procedures were performed in accordance with Spanish (Real Decreto 53/2013) and European (2010/63/UE) legislation and approved by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

Surgically-induced skeletal muscle injury rat model

Rats were anaesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, *i.p.*) and xylazine (10 mg/kg, *i.p.*) before surgical procedure and placed in prone position by the fixation of tail and extremities with adhesive strips to a cork surface exposing the ventral side of the right crus. The surgical procedure for creating skeletal traumatic muscle lesion in the rat gastrocnemius muscle is illustrated in **Fig. 1**. The muscle injury was generated by using an 18 g biopsy needle (Bard® Monopty® Disposable Core Biopsy Instrument, Bard Biopsy Systems, Tempe, USA) with 0.84 mm inner diameter. Transversal biopsy procedure was performed at the myotendinous junction level of the right leg medial gastrocnemius muscle (3 mm from the start of muscle-tendon junction and 2 mm in depth) after shaving the lower extremity and cleaning with ethanol to identify the white Achilles tendon and measure the injury site from the muscle-tendon junction site. Post-surgical analgesia (buprenorphine 0.01 mg/kg) was subcutaneously administered to all operated animals. Our study conforms to the ethical standards in sport and exercise science research [12].

Measurement of muscle injury size in rat medial gastrocnemius muscle

The size of the muscle lesion caused by the biopsy needle in the medial gastrocnemius muscle was measured by measuring the areas in Hematoxylin-Eosin histology images from rat gastrocnemius muscle sections (N=5 for each time-point) at 1, 3, 5, 7, 14, 21, 26, 35 and 46 days post-injury. Microphotographs were

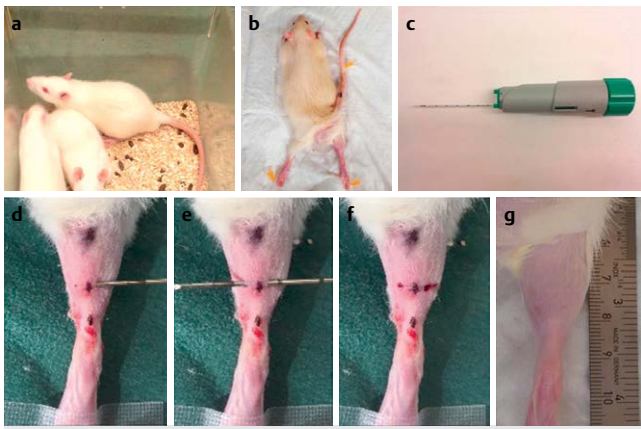


Fig. 1 Surgically-induced skeletal muscle injury rat model. **a** Male Wistar rats were used as the animal model for muscle injury induction using the automatic biopsy needle. **b** Animals were anaesthetized before surgical procedure and placed in prone position by the fixation of tail and extremities. **c** Skeletal muscle injury was generated by using an 18 g biopsy needle (Bard® Monopty® Disposable Core Biopsy Instrument, Bard Biopsy Systems, Tempe, USA). **d** Transverse biopsy procedure in medial gastrocnemius muscle was generated by using the biopsy needle at 3 mm proximal from the muscle-tendon junction site. **e** The lesion spans roughly 50% of the cross-sectional area of the medial gastrocnemius muscle. **f** After biopsy, needle was extracted and external antiseptic was applied. Post-surgical analgesia was subcutaneously administered to all operated animals. **g** One week after surgery the puncture wounds created from the entrance and exit of the biopsy needle were closed.

obtained by using a BX-61 microscope (Olympus) equipped with a DP72 camera (Olympus) and the CellSens® Digital Imaging software (version 1.9). The areas of the injured muscle region and the total medial gastrocnemius were quantified by using the Image J v1.46 software. The size of the muscle lesion was represented by the percentage of the injured area vs. the total area of the medial gastrocnemius muscle.

Histology and immunofluorescence analysis

Animals (N=5 for each time point) were euthanized by intraperitoneal injection of an overdose of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) at 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 18, 21 and 26 days after the injury. Gastrocnemius muscles were excised, and immediately frozen in 2-methylbutane (Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, Karlsruhe, Germany), which was previously super-cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. Frozen medial gastrocnemius were transversely sectioned (10 µm thick) using a Cryotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at below -20°C and mounted on Polylysine™ glass slides (VWR, Leuven, Belgium). Consecutive frozen muscle sections were used for histological and immunofluorescence analysis. For histological analysis, rat skeletal muscle sections were stained with Hematoxylin-Eosin (1 min hematoxylin and 15 s eosin), washed in water, dehydrated with graded ethanol solutions (1 min ethanol 50%, 1 min ethanol 70% twice, 1 min ethanol 90%, 1 min ethanol 100% twice) and cleared in xylene (5 s). After air-drying for 5 min, the slides were mounted with DPX mounting medium and a coverslip (VWR, Madrid, Spain). Hematoxylin Harris solution was purchased from Casa Álvarez (Casa Álvarez, Madrid, España) and eosin solution was prepared by dissolving 0.5 g Eosin Yellowish (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain) in 100 ml water with 200 µl glacial acetic acid (Sigma-

Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain). Ethanol absolute and xylene were obtained from VWR (VWR, Leuven, Belgium).

For immunofluorescence analysis, frozen muscle sections were fixed in cold (-20°C) acetone (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain) for 5 min, air-dried and blocked in PBS containing 3% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain) for 10 min at room temperature and then incubated with primary antibodies diluted 1:100 in PBS (Phosphate buffered saline, Biowest, Barcelona, Spain). The primary antibodies used were against rabbit anti-Collagen I (Abcam, Cambridge, UK), mouse α -smooth muscle actin (α -SMA) (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain) and mouse developmental Myosin Heavy Chain (MHCd, Novocastra, Newcastle, UK) for 16 h in a humid chamber at 4°C. Samples were washed 3 times in PBS and incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor® 568 anti-mouse or Alexa Fluor® 488 anti-rabbit (Invitrogen, Oregon, USA) diluted 1:1000 in PBS in a dark humid chamber for 1 h at room temperature. Finally, slides were washed 3 times with PBS and mounted using a coverslip and Fluoromount-G (Southern Biotech, Madrid, Spain) mounting medium. Fluorescence was evaluated by using a BX-61 microscope (Olympus) using a DP72 camera (Olympus) and CellSens® Digital Imaging software (version 1.9).

Imaging studies by Magnetic Resonance (MRI)

In vivo ¹H-magnetic resonance imaging (MRI) studies were performed daily during 4 weeks at the NMR facilities of the Autonomous University of Barcelona (UAB, Barcelona, Spain) using a 7 T Bruker BioSpec 70/30 USR (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany) system equipped with a mini-imaging gradient set (400 mT/m) and using a quadrature transceiver volume coil with 72 mm inner diameter.

Rats (N=3) were positioned in a bed, which allowed delivery of anesthesia (isoflurane, 1.5–2.0% in O₂ at 1 L/min), with an integrated heat water circuit for body temperature regulation. Body temperature was measured with a rectal probe and maintained at 37 ± 1°C. Respiratory frequency was monitored with a pressure probe and kept between 60–80 breaths/min. Low resolution T2-weighted fast spin-echo images were initially obtained in axial, sagittal and coronal planes to be used as reference scout images. Imaging parameters for these images were: effective echo time (TE_{eff})=36 ms; repetition time (TR)=3 s; echo train length (ETL)=8; field of view (FOV)=6×6 cm²; matrix size (MTX)=128×128; slice thickness (ST)=2 mm; gap between slices (gap)=0.5 mm; number of slices (NS)=25 -axial, 10 -sagittal, 11 -coronal; number of averages (NA)=1. High resolution T2-weighted fast spin-echo images were acquired afterwards in axial, sagittal and coronal planes containing the lesion and the contralateral side. Experimental parameters for these images were: TE_{eff}=25 ms; TR=4 s; ETL=4; FOV=6×6 cm²; MTX=512×256 - for axial and coronal sections and 256×256 for sagittal sections; ST=1 mm; gap=0.1 mm; NS=35 -axial and coronal, and 32 -sagittal; NA=4 -axial and coronal, 2 -sagittal; experimental time =12 min 48 s for axial and coronal images and 6 min 24 s for sagittal images. MRI data were acquired and processed on a Linux computer using Paravision 5.1 software (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany).

Analysis of rat medial gastrocnemius muscle force

The maximum tetanus force (TetF) of the gastrocnemius muscle was analyzed in rats (N=8) anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine

(10 mg/kg, i.p.). Anesthetized animals were placed in prone position in a platform with the knee placed in fully extended position and fixed with 2 needles (one in the knee and the other in the ankle) in order to immobilize the limb. Achilles tendon including the calcaneus was separated from the surrounding tissue leaving the proximal origin, blood supply and nerves intact. The Achilles tendon was cut and attached, by using a tendon hook stretched with a passive force of 100 mN, to a force transducer (TRI-201 Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) connected to a polygraph (Polygraph 2006; Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain). The sciatic nerve was then exposed through a lateral incision on the thigh and connected to an electrode and a stimulator (Universal Kimograph; Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Muscle force analysis was conducted at a constant room temperature of 25–27°C, and the gastrocnemius muscle was covered with mineral oil to prevent muscle drying during the muscle force determination. The TetF was measured by electrical stimulation of sciatic nerve at a frequency of 100 Hz, 0.1 ms pulse width and a voltage of 5 V. For each animal, TetF was determined both in the control (non-injured) left gastrocnemius muscle and the injured right leg gastrocnemius muscle.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (IBM; Armonk, New York, United States). Maximum tetanus force values were normalized to the individual gastrocnemius muscle mass (represented by the TetF divided by the muscle weight and expressed in mN/g).

The normality and homoscedasticity of data were studied for each parameter to apply the correct statistical methods (parametric or non-parametric). The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normal distribution of the data.

Data showed a normal distribution and paired Student's *t* test were used to compare statistical differences in maximal muscle force between animal.

The power analysis for the *t*-paired test was automatically performed to detect a minimum difference in means of 0.8 and with an alpha value of 0.05. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. The results are presented as mean \pm SD.

Results

Analysis of surgically-induced muscle injury size in rat medial gastrocnemius muscle

The size of the muscle injured area caused by the biopsy needle (○ Fig. 1) was evaluated in H-E stained muscle sections at 1, 3, 5, 7, 14, 21, 26, 35 and 46 days post-injury (○ Fig. 2). Both injured muscle area and the total area of medial gastrocnemius muscle were quantified by using the Image J v1.46 software after marking out both the specific injured area and the total area of medial gastrocnemius muscle (○ Fig. 2a). As shown in ○ Fig. 2b, the surgically-induced muscle injury with the biopsy needle caused a lesion in the rat medial gastrocnemius of $30.0 \pm 5.9\%$ of the total transversal area of the muscle just 24 h post-injury, being at this time-point when the injured area reached its maximum size. From this time on, the measured size values of the injured area decreased progressively until the day 46 post-injury (at the end period of muscle regeneration process) when was approximately the 2% of the total area of medial gastrocnemius muscle.

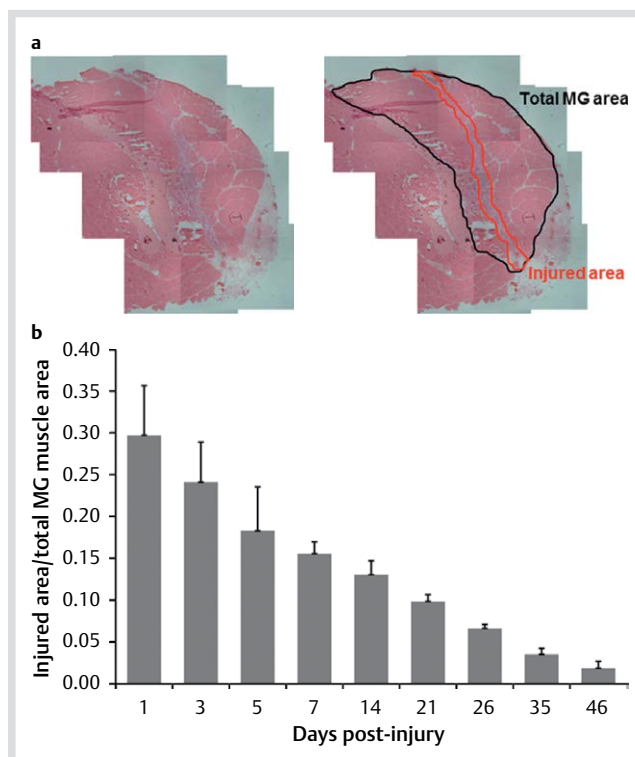


Fig. 2 Quantification of the size of the lesion induced by the biopsy-needle in the rat model. The size of the muscle injured area caused by the biopsy needle was evaluated in H-E stained rat ($N = 5$ for each time-point) muscle transversal sections at 1, 3, 5, 7, 14, 21, 26, 35 and 46 days post-injury. **a** Representative image (14 days post-injury) of the muscle H-E stained sections used for measurement of the size of the injury. Both injured muscle area and the total area of medial gastrocnemius (MG) muscle were marked out and quantified by using the Image J v1.46 software. **b** The percentage of the injured muscle respecting to the total medial gastrocnemius muscle area was measured. Values are presented as the mean \pm SD of the injured area vs. total muscle area.

Histological analysis of skeletal muscle injury longitudinal evolution

By means of H-E stain (○ Fig. 3), we corroborated that the histological changes in our rat model of skeletal muscle injury highly reproduced the necrosis and regeneration processes observed in other animal models of induced muscle injury [11, 26, 39] or animal models of spontaneous skeletal muscle injury, such as the dystrophic mdx-mice [22]. As a result, 12–24 h after surgically-induced injury our rat animal model showed the presence of necrotic fibers and edema with some infiltrating inflammatory cells and macrophages. This was followed by an inflammatory phase (1–3 days post-injury) where the injured area was extensively invaded by macrophages and inflammatory cells and an ensuing regenerative phase in which small diameter, newly formed, regenerating basophilic fibers started to appear (3–5 days post-injury). From 5–7 days post-injury, new formed basophilic fibers progressively grew in the injured area concomitantly with the progressive withdrawal of the inflammatory cells (7–14 days post-injury). 3 weeks after surgically-induced injury, muscle damaged tissue was completely replaced by the new muscle fibers. From 26 days after injury, the tissue showed a fully regenerated aspect with the presence of centrally-nuclei muscle fibers and the absence of inflammation-related cells. Finally, 46 days post-injury the tissue showed normal characteristics and completely regenerated structure.

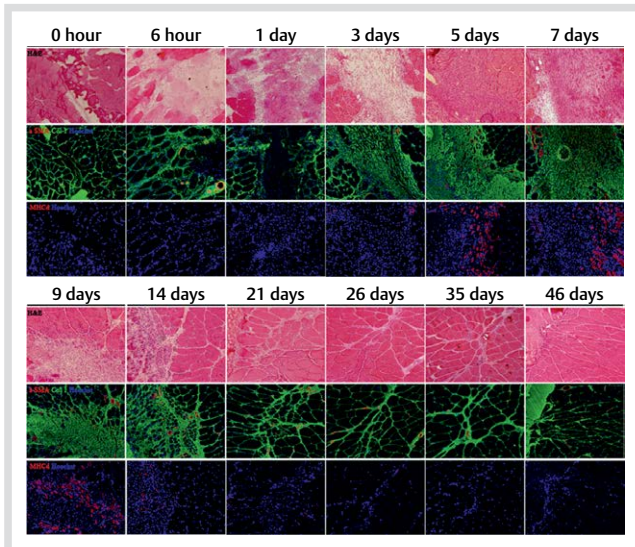


Fig. 3 Histologic and immunofluorescence analysis of the longitudinal evolution of skeletal muscle injury in the rat model. Representative images (N = 5 for each time-point) show Hematoxylin-Eosin stained sections (upper panel) and immunofluorescence analysis for collagen-I/ α SMA (mid panel) and MHCd expression (lower panel) at different times (0 and 6 h and 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21, 26, 35 and 46 days post-injury) after the generation of surgically-induced medial gastrocnemius muscle injury in rats. Images show ($\times 100$) microphotographs for all panels.

Immunofluorescence analysis of skeletal muscle injury longitudinal evolution

In order to determine the muscle regeneration and fibrogenesis experienced in our rat model of skeletal muscle injury, we performed a study by immunofluorescence (○ Fig. 3) to analyze, on the one hand, the expression levels of the developmental/embryonic form of myosin heavy chain (MHCd), a well-known marker for muscle development [21, 22] and adult muscle regeneration after injury [22] and, on the other hand, the levels of the fibrosis marker collagen-I and the angiogenesis marker α -SMA, which stains for the smooth muscle layer of blood vessels and capillaries [14].

MHCd was analyzed during muscle necrosis and regeneration process by immunofluorescence. In adult muscle MHCd is only expressed during muscle regeneration after injury and in the first period of myofiber formation until its replacement by the mature isoforms (fast or slow) myosin heavy chains. In our skeletal muscle injury model, MHCd levels were undetectable during the first days post-injury. MHCd started to appear 3 days after the lesion and showed a progressive increase, reaching its maximum levels of expression around 7–9 days post-injury. From this time on, corresponding to the last phases of muscle regeneration and myofiber differentiation, MHCd expression decreased gradually to be undetectable beyond 26 days after muscle injury.

We also analyzed the expression levels of the fibrotic marker collagen-I during all the process of muscle regeneration after injury. Collagen-I, detected specifically surrounding the fibers' perimeter in non-injured muscle fibers, strongly increased its expression and deposition in injured areas just after the muscle lesion was created and persisted during the inflammatory and regeneration periods. Collagen-I showed a prompt and strong increase from the first days post-injury, demonstrating an abundant deposition in injured areas from day 3 post-injury and

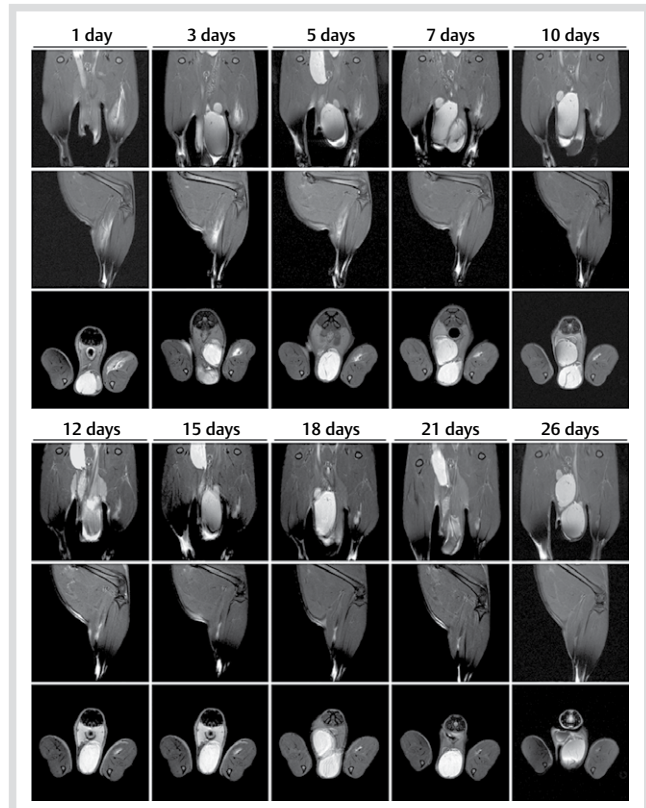


Fig. 4 In vivo MRI imaging analysis of the longitudinal evolution of skeletal muscle injury in the rat model. Representative images (N = 3) show coronal (upper panel), sagittal (mid panel) and axial (lower panel) planes of the in vivo ^1H -magnetic resonance imaging (MRI) studies performed at different times (1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 21 and 26 days post-injury) after medial gastrocnemius muscle surgically-induced injury in rats. Both edema around central tendon and the typical high signal feather shape, which is characteristic of grade I-II muscle lesions in human athletes, was clearly visible from the first day post-injury. MRI studies were carried out by using a 7T Bruker BioSpec 70/30 USR (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany) system equipped with a mini-imaging gradient set (400 mT/m) and using a quadrature transceiver volume coil with 72 mm inner diameter. Experimental parameters for these images are indicated in Methods section. MRI data were acquired and processed on a Linux computer using Paravision 5.1 software (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany).

reaching its maximum levels around 7–9 days after injury. From day 14 post-injury, and coinciding with the presence of newly formed myofibers, collagen-I started to decrease progressively but its presence was still detectable 35 days after muscle lesion forming a scar-like tissue clearly visible following the direction where the lesion was created by crossing the muscle from side to side. The α -SMA staining demonstrated the increase in the number of capillaries, specially in regenerating areas, from day 9 up to 21 post-injury where the new fibers are growing to regenerate the muscle tissue and the requirement of blood supply is increased (○ Fig. 3).

MRI analysis of the longitudinal evolution of skeletal muscle injury

We performed a longitudinal study of the lesion in the rat model by analyzing the evolution of skeletal muscle injury by using high resolution MRI either in the axial, coronal or sagittal planes. As shown in ○ Fig. 4, the surgically-induced muscle injury produced a myotendinous break with retraction and gap. This mus-

cle lesion caused a strong edema which was clearly detected at 24h post-injury and localized around the central tendon. Remarkably, we observed the typical high signal feather shape, which is characteristic of the most frequently observed grade II-III muscle lesions in elite athletes. From this point on, edema progressively decreased until it was practically undetectable at 26 days post-injury.

Surgically-induced skeletal muscle injury in rat model mimics muscle lesions observed in human elite athletes

Next, we evaluated the similarities of the surgically-induced lesion created in our rat model with those observed in professional athletes by comparing the MRI images obtained in rats with MRI images from elite soccer players. As shown in **Fig. 5**, we demonstrated that our muscle injury model in rats highly reproduced the human lesions observed in professional athletes. In our rat model, the surgically-induced skeletal muscle injury caused a typical grade I-II lesion (**Fig. 5a**), which was highly comparable to the grade I and grade II lesions observed in the proximal long head biceps femoris of a 21 years-old and in the proximal head biceps of a 23 years-old male professional footballers, respectively (**Fig. 5b, c**). The muscle injury in the rat model caused an important edema and “feathery high signal” along skeletal muscle fibers which is typical of these types of injuries in professional athletes and highly mimicked the hyperintensity area of edema in form of feather representative of grade I lesions and the hypertensity area of edema, with gap and retraction were the tendon is commonly involved typical of grade II muscle injuries.

Muscle force decrease after surgically-induced skeletal muscle injury

The maximum tetanus force was measured 2 weeks after muscle injury both in control and in injured medial gastrocnemius muscles of each rat. As shown in **Fig. 6**, injured muscles showed a significant decrease of the 29.1% ($P=0.001$) in the maximum contraction force demonstrating the efficacy of our new muscle injury approach in skeletal muscle force reduction. The mean values of TetF in control muscles and injured muscles were 643 ± 163 and 456 ± 107 mN/g, respectively.

Discussion

In this study, we present a new animal model of surgically-induced skeletal muscle injury in rats, which is easy to reproduce and closely mimics the muscle lesions observed in human elite sportsmen. The new in vivo model of skeletal muscle injury will be helpful for researchers in the fields of skeletal muscle injuries and regeneration, as well as for the in vivo testing of new therapeutic approaches to prevent or ameliorate muscle lesions. By using our newly established technical approach of surgically-induced skeletal muscle injury, we were able not only to determine the size of the injury and all the histological and molecular changes in the muscle necrosis-regeneration process by histology and immunofluorescence but also to corroborate the similarities of our muscle injury rat model with the muscle lesions observed in professional athletes by using MRI imaging analysis. Furthermore, we evaluated the decrease in the medial gastrocnemius muscle force caused by the muscle injury in the rat model, in order to assess the impact on muscle strength related to surgically-induced lesions.

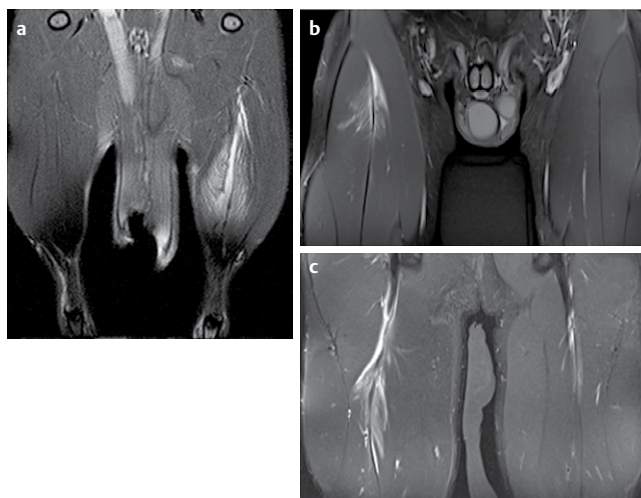


Fig. 5 MRI in vivo imaging of skeletal muscle lesion comparison between surgically-induced rat muscle injury model and human elite athletes. **a** Coronal T2 MRI image of a 2-month-old rat 24h after injury in the medial gastrocnemius muscle. Image shows the edema and “feathery high signal” along the muscle fibers typical of these muscle injuries in human professional athletes. **b** Coronal T2 MRI image of the proximal rectus femoris of a 21-year-old male professional footballer showing a Grade I injury. Image shows small hyper intensity area of edema in feather-like shape. **c** Coronal T2 MRI image of the proximal head biceps showing a Grade II injury of a 23 year-old male professional footballer. Image shows important hypertensity area of edema, with gap and retraction and common tendon involved.

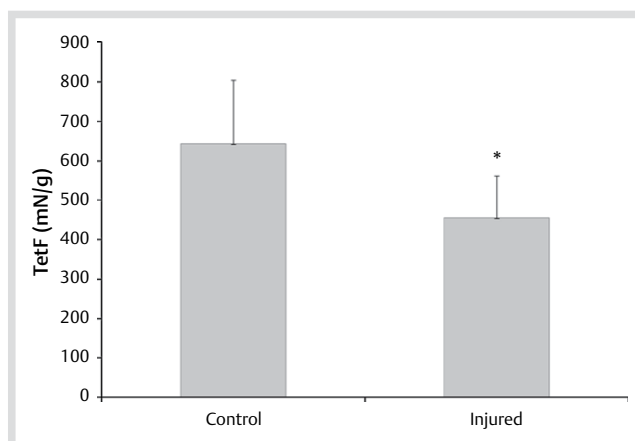


Fig. 6 Measurement of muscle strength in the surgically-induced muscle injury rat model. Maximum tetanus force (TetF) was measured in rats ($N=8$) after 2 weeks of surgically-induced muscle injury. TetF values were normalized to medial gastrocnemius muscle weight for the control and injured rat muscles. Values are presented as mean \pm SD (* indicates $P=0.001$).

The evolution of the muscle injury induced by the biopsy needle in the rat skeletal muscle was evaluated by H-E staining, immunofluorescence analysis of muscle regeneration and fibrosis markers, such as MHCd and Collagen-I, and MRI-based in vivo imaging analysis. By means of H-E stain (**Fig. 3**), we corroborated that the histological changes in our rat model of skeletal muscle injury highly reproduced the necrosis, inflammation and regeneration processes observed in animal models of spontaneous skeletal muscle injury, such as the dystrophic mdx-mice [22]. We demonstrated that the surgically-induced muscle injury followed the same orchestrated process of skeletal muscle

regeneration after injury. In this sense, we analyzed the expression of MHCd, a well-known marker of muscle regeneration and the formation of new fibers in adult muscle [22,29], which showed a similar pattern of expression than those detected in spontaneous muscle lesions in dystrophic animals [22]. MHCd expression increased from 3 to 14 days, indicating the presence of numerous newly formed regenerating fibers in the damaged area and then progressively disappears, becoming undetectable 21 days after injury coinciding with the maturation phase of regenerated fibers. On the other hand, we analyzed the possible intramuscular fibrosis induced in our model by determining the presence of the fibrotic marker type-I collagen. Type-I collagen expression showed a strong increase in the injured area from day 3 to day 9 after muscle damage. Beginning from day 14 post-injury type-I collagen deposition was progressively reduced, but a permanent scar-like type-I collagen positive extracellular matrix accumulation could be still detected one month after muscle lesion was created (◉ Fig. 3). Muscle healing in sports-derived skeletal muscle injuries is commonly followed by scar tissue formation after injury [34]. Intramuscular scarring often represents an important sequel derived from muscle injuries in human athletes provoking muscle weakness and increasing the probability of muscle re-injury. Our skeletal muscle injury-model therefore represents a useful approach to studying such measures as innovative therapeutic approaches to reduce the fibrous tissue accumulation or scarring prevention, by testing anti-fibrotic agents such as Suramin, a TGF- β 1 antagonist which has demonstrated its ability to reduce fibrous scar formation in muscle and enhance muscle strength in strain-injured skeletal muscle [5], or CAR-decorin, a potent inhibitor of scar formation by neutralization of both growth factors responsible for scarring, TGF- β 1 and - β 2 isoforms [20].

Since most of the human lesions related to sports are often evaluated by non-invasive imaging techniques such as MRI, we performed a longitudinal study in order to evaluate the progression of the disease and to compare our findings with the most common injuries detected in skeletal muscle of elite athletes. Remarkably, the comparison of the MRI analysis of the lesions caused by our surgical approach in rats showed a strong homology to grade I-II type lesions observed in elite soccer players (◉ Fig. 5). Both edema and the feather-like shape was very similar between our rat model and elite soccer players after 24h of skeletal muscle injury. As observed in human athletes, the surgically-induced muscle injury in rats showed a strong edema 24h after muscle damage, which was slowly and progressively re-absorbed throughout the following weeks.

We also performed an analysis of the muscle force of rat skeletal muscle after injury, in order to determine the reduction in muscle strength after muscle injury in our rat model due to biopsy needle-induced muscle lesion. The measurement of the TetF demonstrated a decrease of approximately 30% of the total medial gastrocnemius muscle force 2 weeks after injury (◉ Fig. 6) caused by the surgically-induced injury. Our results corroborate previous data reported in a toxin-induced muscle injury rat model, where a 37% decrease in Tetanic force was described in rat gastrocnemius muscle 2 weeks after injury induced by intramuscular bupivacaine injection [24].

In summary, this study presents a new model of surgically-induced skeletal muscle injury in rats, which mimics the complete process of necrosis and regeneration observed in muscle injuries and reproduces very closely the most frequent skeletal

muscle lesions observed in sports human clinics. This reproducible experimental animal model allows not only for the study of the complex regulatory pathways involved in the skeletal muscle degeneration-regeneration process but also opens new avenues for reliable assessment of the efficacy of both stem cell-based and pharmacological therapeutic approaches aimed at enhancing muscle tissue repair and preventing fibrosis and other adverse effects in sports-related skeletal muscle injuries.

Acknowledgements

▼ This study was supported by funds MTN20100101 and MTN2012005 from Fundació Leitat (Barcelona, Terrassa, Spain) and F. Futbol Club Barcelona (Barcelona, Spain) by its initiative MuscleTech Network (Barcelona, Spain). We thank Marta Rosal and Alejandro Rojo from the Animal Facility Unit of Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) and Silvia Lope from NMR service facilities (SeRMN) belonging to Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Bellaterra, Spain) for their valuable technical assistance.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Affiliations

- ¹ Leitat Foundation, Leitat Technological Center, Carrer de la Innovació 2, Terrassa, Barcelona, Spain
- ² Bioengineering, Orthopedics and Pediatric Surgery Laboratory, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- ³ Physiology Department, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁴ Ultrasound Unit, Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- ⁵ School of Medicine, University of Tampere, Tampere, Finland
- ⁶ Department of Orthopedics & Traumatology, Tampere University Hospital, Tampere, Finland
- ⁷ Translational Research in Fetal Surgery for Congenital Malformations Laboratory, Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy, Cincinnati Children's Hospital Medical Center (CCHMC), Cincinnati, Ohio, USA
- ⁸ Medical Services, Futbol Club Barcelona, Ciutat Esportiva Futbol Club Barcelona, Barcelona, Spain

References

- 1 *Aspelin P, Ekberg O, Thorsson O, Wilhelmsson M, Westlin N.* Ultrasound examination of soft tissue injury of the lower limb in athletes. *Am J Sports Med* 1992; 20: 601–603
- 2 *Best TM, Hunter KD.* Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000; 11: 251–266
- 3 *Bischoff R.* In: Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds.). *The satellite cell and muscle regeneration.* New York: McGraw-Hill; 1994: 97–118
- 4 *Bubnov R, Yevseenko V, Semenov I.* Ultrasound guided injections of platelets rich plasma for muscle injury in professional athletes. *Comparative study.* *Med Ultrason* 2013; 15: 101–105
- 5 *Chan Y-S, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J.* The use of suramin, an anti-fibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med* 2005; 33: 43–51
- 6 *Chargé SBP, Rudnicki MA.* Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209–238
- 7 *Ebbeling CB, Clarkson PM.* Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med* 1989; 7: 207–234
- 8 *Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ.* Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 2003; 14: 261–271
- 9 *Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z.* Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* 1993; 3: 210–256
- 10 *Hamilton B, Valle X, Rodas G, Til L, Pruna Grive R, Gutierrez Rincon Ja, Tol JL.* Classification and grading of muscle injuries: a narrative review. *Br J Sports Med* 2014; 49: 306

- 11 Harris JB, Johnson MA. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1978; 5: 587–600
- 12 Harris DJ, Atkinson G. Ethical standards in sport and exercise science research: 2014 update. *Int J Sports Med* 2013; 34: 1025–1028
- 13 Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91: 534–551
- 14 Horio T, Fujita M, Tanaka Y, Ishihara M, Kishimoto S, Nakamura S, Hase K, Maehara T. Efficacy of fragmin/protamine microparticles containing fibroblast growth factor-2 (F/P MPs/FGF-2) to induce collateral vessels in a rabbit model of hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 2011; 54: 791–798
- 15 Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84-A: 822–832
- 16 Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23: 801–810
- 17 Järvinen TA, Järvinen M, Kalimo H. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles Ligaments Tendons J* 2013; 3: 337–345
- 18 Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Aärimala V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007; 21: 317–331
- 19 Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005; 33: 745–764
- 20 Järvinen TAH, Ruoslahti E. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 21671–21676
- 21 Lehto MU, Järvinen MJ. Muscle injuries, their healing process and treatment. *Ann Chir Gynaecol* 1991; 80: 102–108
- 22 Marotta M, Sarria Y, Ruiz-Roig C, Munell F, Roig-Quilis M. Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2007; 17: 707–718
- 23 Mauch F, Best R, Bauer G. Current treatment concepts for muscular injuries. *Unfallchirurg* 2013; 116: 488–496
- 24 McNeill Ingham SJ, de Pochini AC, de Oliveira DA, Garcia Lisboa BC, Beutel A, Valero-Lapchik VB, Ferreira AM, Abdalla RJ, Cohen M, Han SW. Bupivacaine Injection leads to muscle force reduction and histologic changes in a murine model. *PM&R* 2011; 3: 1106–1109
- 25 Meeson AP, Hawke TJ, Graham S, Jiang N, Elterman J, Hutcheson K, Dimaio JM, Gallardo TD, Garry DJ. Cellular and molecular regulation of skeletal muscle side population cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1305–1320
- 26 Mitchell CA, McGeachie JK, Grounds MD. Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: A quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell Tissue Res* 1992; 269: 159–166
- 27 Pollock N, James SLJ, Lee JC, Chakraverty R. British athletics muscle injury classification: a new grading system. *Br J Sports Med* 2014; 48: 1347–1351
- 28 Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 1995; 72: 341–347
- 29 Roig-Quilis M, Roma J, Marotta M, Sarria Y, Fargas A. Muscle regeneration following glycerol injection mimic that of mdx-mice degenerative-regenerative groups. *Rev Neurol* 2004; 38: 1101–1108
- 30 Scholz D, Thomas S, Sass S, Podzuweit T. Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Mol Cell Biochem* 2003; 246: 57–67
- 31 Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994; 123: 213–257
- 32 De Smet AA, Best TM. MR imaging of the distribution and location of acute hamstring injuries in athletes. *Am J Roentgenol* 2000; 174: 393–399
- 33 Timpka T, Jacobsson J, Bickenbach J, Finch CF, Ekberg J, Nordenfelt L. What is a sports injury? *Sports Med* 2014; 44: 423–428
- 34 Vaittinen S, Hurme T, Rantanen J, Kalimo H. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscul Disord* 2002; 12: 584–587
- 35 Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Mol Cell Biochem* 2007; 298: 151–159
- 36 Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S. Expression of myosin isoforms during netoxin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 1990; 141: 24–40
- 37 Woods C, Hawkins RD, Maltby S, Hulse M, Thomas A, Hodson A. The Football Association Medical Research Programme: an audit of injuries in professional football – analysis of hamstring injuries. *Br J Sports Med* 2004; 38: 36–41
- 38 Woolf AD, Pfeleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003; 81: 646–656
- 39 Yan Z, Choi S, Liu X, Zhang M, Schageman JJ, Lee SY, Hart R, Lin L, Thurmond FA, Williams RS. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* 2003; 278: 8826–8836

Artículo II

Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combine. Contreras-Muñoz P.^{1,2}, Torrella JR.³, Serres X.⁴, Rizo-Roca D.⁴, De la Varga M.¹, Viscor G.³, Martínez-Ibáñez V.², Peiró J. L.^{2,5}, Järvinen T. A. H.⁶, Rodas G.^{1,7}, Marotta M.^{1,2} *The American Journal of Sports Medicine.* 2017.

DOI: 10.1177/0363546517702864

1 Leitat Foundation, Leitat Technological Center, Barcelona, Spain.

2 Bioengineering, Cell Therapy and Surgery in Congenital Malformations Laboratory, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

3 Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

4 Ultrasound Unit, Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

5 Translational Research in Fetal Surgery for Congenital Malformations Laboratory, Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA.

6 Medical School, University of Tampere and Tampere University Hospital, Tampere, Finland.

7 *Medical Services, Futbol Club Barcelona, Ciutat Esportiva Futbol Club Barcelona, Barcelona, Spain.*



Postinjury Exercise and Platelet-Rich Plasma Therapies Improve Skeletal Muscle Healing in Rats But Are Not Synergistic When Combined

Paola Contreras-Muñoz,^{*†} PhD, Joan Ramon Torrella,[‡] PhD, Xavier Serres,[§] MD, PhD, David Rizo-Roca,[‡] PhD, Meritxell De la Varga,^{*} PhD, Ginés Viscor,[‡] PhD, Vicente Martínez-Ibáñez,[†] MD, PhD, José Luis Peiró,^{†||} MD, PhD, Tero A. H. Järvinen,[¶] MD, PhD, Gil Rodas,^{*#} MD, PhD, and Mario Marotta,^{*†**} PhD
Investigation performed at Vall d'Hebron Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Background: Skeletal muscle injuries are the most common sports-related injury and a major concern in sports medicine. The effect of platelet-rich plasma (PRP) injections on muscle healing is still poorly understood, and current data are inconclusive.

Purpose: To evaluate the effects of an ultrasound-guided intramuscular PRP injection, administered 24 hours after injury, and/or posttraumatic daily exercise training for 2 weeks on skeletal muscle healing in a recently established rat model of skeletal muscle injury that highly mimics the muscle trauma seen in human athletes.

Study Design: Controlled laboratory study.

Methods: A total of 40 rats were assigned to 5 groups. Injured rats (medial gastrocnemius injury) received a single PRP injection (PRP group), daily exercise training (Exer group), or a combination of a single PRP injection and daily exercise training (PRP-Exer group). Untreated and intramuscular saline-injected animals were used as controls. Muscle force was determined 2 weeks after muscle injury, and muscles were harvested and evaluated by means of histological assessment and immunofluorescence microscopy.

Results: Both PRP (exhibiting 4.8-fold higher platelet concentration than whole blood) and exercise training improved muscle strength (maximum tetanus force, TetF) in approximately 18%, 20%, and 30% of rats in the PRP, PRP-Exer, and Exer groups, respectively. Specific markers of muscle regeneration (developmental myosin heavy chain, dMHC) and scar formation (collagen I) demonstrated the beneficial effect of the tested therapies in accelerating the muscle healing process in rats. PRP and exercise treatments stimulated the growth of newly formed regenerating muscle fibers (1.5-, 2-, and 2.5-fold increase in myofiber cross-sectional area in PRP, PRP-Exer, and Exer groups, respectively) and reduced scar formation in injured skeletal muscle (20%, 34%, and 41% of reduction in PRP, PRP-Exer, and Exer groups, respectively). Exercise-treated muscles (PRP-Exer and Exer groups) had significantly reduced percentage of dMHC-positive regenerating fibers (35% and 47% decrease in dMHC expression, respectively), indicating that exercise therapies accelerated the muscle healing process witnessed by the more rapid replacement of the embryonic-developmental myosin isoform by mature muscle myosin isoforms.

Conclusion: Intramuscular PRP injection and, especially, treadmill exercise improve histological outcome and force recovery of the injured skeletal muscle in a rat injury model that imitates sports-related muscle injuries in athletes. However, there was not a synergistic effect when both treatments were combined, suggesting that PRP does not add any beneficial effect to exercise-based therapy in the treatment of injured skeletal muscle.

Clinical Relevance: This study demonstrates the efficacy of an early active rehabilitation protocol or single intramuscular PRP injection on muscle recovery. The data also reveal that the outcome of the early active rehabilitation is adversely affected by the PRP injection when the two therapies are combined, and this could explain why PRP therapies have failed in randomized clinical trials where the athletes have adhered to postinjection rehabilitation protocols based on the principle of early, active mobilization.

Keywords: skeletal muscle injury; rat model; PRP intramuscular injection; physical exercise therapy; muscle healing

contusion and strain injuries represent approximately 55% of all acute, sports-related injuries.

Skeletal muscle has the ability to self-repair in response to injury by triggering a highly synchronized regeneration process involving the activation of various cellular responses.^{10,11} The repair of skeletal muscle follows a set pattern, which can be divided into 3 overlapping phases^{20,22,24}: degeneration (1-3 days after injury), regeneration (3-4 weeks after injury), and remodeling (3-6 months after injury). The skeletal muscle possesses a substantial regenerative potential in the form of its own stem cells, the satellite cells; however, like most tissues, the injured skeletal muscle heals by a repair process that will result in the formation of nonfunctional scar tissue between the ruptured skeletal muscle fibers.

Substantial efforts have been dedicated, especially in the field of sports medicine, to the development of new therapeutic strategies to improve skeletal muscle healing and functional recovery after muscle injury.^{9,39} During the last few years, the use of platelet-rich plasma (PRP) has been widely evaluated as a potential treatment of sports-related skeletal muscle injuries, at both preclinical^{7,13-15,19} and clinical^{1††} levels, but the data endorsing its use and the current findings remain controversial.^{38,43} The basis for the widespread application of PRP for the treatment of muscle injuries is related to the fact that it is a simple, efficient, and minimally invasive procedure for collecting autologous growth factors, which may activate, modulate, accelerate, or ameliorate the tissue-healing process at a cellular level.^{15,19,21,47} During the last decade, intramuscular PRP injection has been pointed out as a promising therapeutic strategy for the treatment of skeletal muscle injuries. Despite the biological potential of PRP to stimulate tissue regeneration as well as a large amount of preclinical data to support its use, PRP therapy has recently failed in 2 placebo-controlled, randomized clinical trials (RCTs) performed on athletes with acute skeletal muscle injury.^{18,45} The PRP products used in the 2 RCTs were obtained by using commercially available PRP purification systems that permit the separation and purification of the PRP from red blood cells and buffy coat. These systems provide an increase of 2 to 3 times the number of platelets and generate a platelet-rich and leukocyte-poor PRP product.^{18,45} In fact, the second RCT compared PRP (high in platelets) and platelet-poor plasma (PPP) injections.¹⁸ A small difference

in the return-to-play time was identified between the groups (no difference was reported between the PRP and untreated groups), but no difference was identified in the rerupture rates between the PRP and the PPP groups.¹⁸ Interestingly, the injured athletes enrolled in both RCTs adhered to strict postinjection rehabilitation protocols.

The aim of our study was to evaluate the beneficial effects of an early, active rehabilitation protocol or PRP administration after muscle injury and to determine the potential synergistic effect of both treatments when combined, by using a well-characterized experimental skeletal muscle injury model in rats that reproduces the injuries seen in human athletes.¹² To do this, we wanted to simulate the study protocols of the recently published RCTs on PRP therapy in the treatment of injured skeletal muscle^{18,45} by addressing the respective individual effects of PRP and early active rehabilitation as well as their potential interaction on the experimental skeletal muscle injury model using a classic 2 × 2 study design.

METHODS

Animals, Surgery, and Treatments

Forty-five male (8-week-old) Wistar rats (Harlan Laboratories Ltd) were used as an animal model, 5 of which were used for blood collection and PRP preparation. Rats were housed at 22°C to 24°C and maintained on a 12-hour light-dark cycle. Water and food were given ad libitum during the experiments. All procedures were performed in accordance with national (Royal decree 53/2013) and European (2010/63/UE) legislation.

Before the skeletal muscle injury was induced, all animals were familiarized with running on a motor-driven treadmill (Figure 1A) by following an endurance training protocol, consisting of daily sessions in which the duration and velocity were progressively increased during a 2-week training period (Table 1).

After 2 weeks of preinjury training, skeletal muscle injury was induced surgically just proximal to the myotendinous junction of the medial gastrocnemius muscle in all rats, as previously described.¹² Rats were anaesthetized with a mixture of ketamine (75 mg/kg, intraperitoneally [ip]) and xylazine (10 mg/kg, ip) before the surgical procedure. The muscle injury was generated by using an

††References 1, 2, 5, 8, 16, 18, 40, 42, 44-46, 48.

**Address correspondence to Mario Marotta, PhD, Leitat Technological Center, MuscleTech Network, C/Innovació No. 2, 08225, Terrassa (Barcelona), Spain (email: mmarotta@leitat.org).

*Leitat Foundation, Leitat Technological Center, Barcelona, Spain.

†Bioengineering, Cell Therapy and Surgery in Congenital Malformations Laboratory, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

‡Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

§Ultrasound Unit, Department of Radiology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

||Translational Research in Fetal Surgery for Congenital Malformations Laboratory, Center for Fetal, Cellular and Molecular Therapy, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA.

*Medical School, University of Tampere and Tampere University Hospital, Tampere, Finland.

#Medical Services, Futbol Club Barcelona, Ciutat Esportiva Futbol Club Barcelona, Barcelona, Spain.

One or more of the authors has declared the following potential conflict of interest or source of funding: This study was supported by funds MTN2012005 from Fundació Leitat (Barcelona, Terrassa, Spain) and F. Futbol Club Barcelona (Barcelona, Spain) by its initiative MuscleTech Network (Barcelona, Spain).

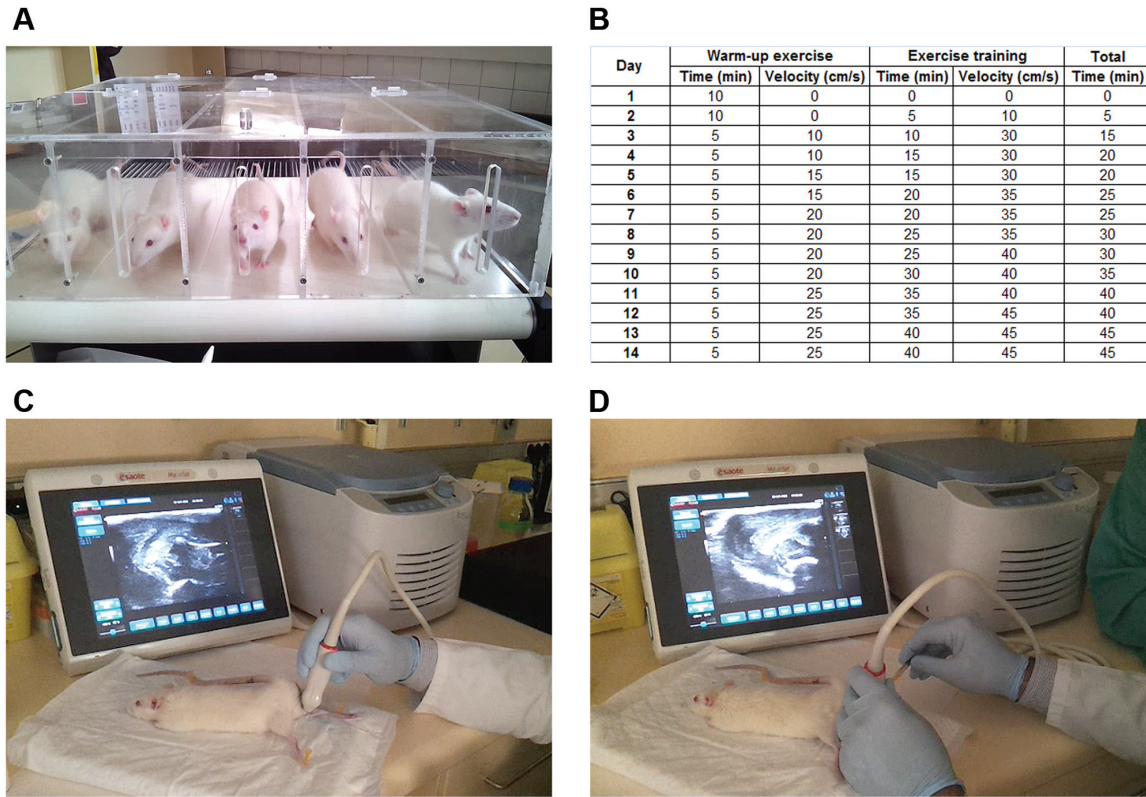


Figure 1. Platelet-rich plasma (PRP) and exercise treatments in Wistar rats after muscle injury. (A) Exercise-treated animals were subjected to daily treadmill physical activity. (B) The exercise protocol consisted of daily treadmill physical activity for 14 days in which the duration of exercise sessions was increased progressively from 10 to 45 minutes. (C) Before PRP administration, the site of the injury in gastrocnemius muscle was localized by ultrasonography. (D) PRP administration was performed at 24 hours after injury by ultrasound-guided intramuscular injection in the site of the injury.

TABLE 1
Training Treadmill Exercise Protocol
Before Muscle Injury^a

Day	Warm-up Exercise		Exercise Training		Total
	Duration, min	Velocity, cm/s	Duration, min	Velocity, cm/s	Duration, min
1	10	0	0	0	0
2	10	0	5	10	5
3	5	10	10	30	15
4	5	10	10	30	15
5	5	15	15	30	20
6	5	15	15	35	20
7	5	20	20	35	25
8	5	20	20	35	25
9	5	20	25	40	30
10	5	20	25	40	30
11	5	25	30	40	35
12	5	25	30	45	35
13	5	25	35	45	40
14	5	25	35	45	40

^aThe exercise protocol consisted of daily treadmill physical activity for 14 days in which the duration of exercise sessions was increased progressively from 10 to 40 minutes.

18-gauge biopsy needle (Bard Monopty Disposable Core Biopsy Instrument, Bard Biopsy Systems). A transverse biopsy procedure was performed at the myotendinous junction level of the right leg medial gastrocnemius muscle (3 mm from the start of muscle-tendon junction and 2 mm in depth). Postsurgical analgesia (buprenorphine 0.01 mg/kg) was subcutaneously administered to all operated animals.

Rats were randomly divided into 5 groups after induction of skeletal muscle injury (n = 8 per group):

1. Untreated group: No treatment was administered after injury.
2. Saline group: A single ultrasound (US)-guided intramuscular injection of 50 μ L sterile saline solution (Grifols) in the site of the lesion was administered at 24 hours after injury.
3. Exercise (Exer) group: The rats were subjected to a daily exercise training protocol for 2 weeks after muscle lesion (Figure 1, A and B).
4. Platelet-rich plasma (PRP) group: A single US-guided intramuscular injection of PRP solution (50 μ L) was administered at 24 hours after injury in the site of the muscle lesion (Figure 1, C and D; also see the online Video Supplement).

5. Platelet-rich plasma + exercise (PRP-Exer) group: Rats were subjected to a combined treatment of a single US-guided intramuscular injection of PRP solution (50 μ L) administered at 24 hours after injury and the same daily exercise training protocol as in group 3 (Figure 1B) during 2 weeks.

All US procedures were performed by using a portable MyLab ONE US device (Esaote SpA) and a SL3116 22MHz Linear transducer (Esaote SpA) with a frequency range of 8 to 22 MHz. An experienced radiologist in musculoskeletal ultrasonography carried out all of the US-guided procedures in the rat model.

Blood Collection and Preparation of Platelet-Rich Plasma

Five male Wistar rats (littermates) were used for PRP preparations as previously described.⁵¹ Whole blood (3.5-4 mL) was drawn from each rat via intracardiac puncture after euthanasia by CO₂ inhalation. The blood was collected into 2.7-mL BD Vacutainer Plus plastic citrate tubes (BD Biosciences) containing citrate phosphate dextrose as anticoagulant and was centrifuged at 400g at 4°C for 10 minutes. Blood was separated into 3 layers: plasma in the supernatant, red blood cells at the bottom, and a buffy coat layer in the middle. Plasma fraction was collected and pooled into a 15-mL centrifuge tube and was spun for 10 minutes at 800g and 4°C to concentrate the PRP fraction. Then 0.9 mL of PRP solution was pipetted from the bottom of the tube. The prepared PRP and whole blood of the rats were subjected to platelet and white blood cell counting with a cell counter BC-5000Vet Auto Hematology Analyzer (Mindray). No activating agent was applied to the PRP before injection.

Measurement of Muscle Force

For measurement of contractile muscle force, rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, ip) and xylazine (10 mg/kg, ip). Animals were placed in prone position in a platform with the knee placed in fully extended position and fixed with 2 needles (one in the knee and the other in the ankle) to immobilize the limb. The Achilles tendon including the calcaneus was separated from the surrounding tissue, leaving the proximal origin, blood supply, and nerves intact. The Achilles tendon was attached by use of a tendon hook stretched with a passive force of 100 mN to a force transducer (TRI-201, Letica Scientific) connected to a polygraph (Polygraph 2006; Letica Scientific). The sciatic nerve was then exposed through a lateral incision on the thigh and connected to an electrode and a stimulator (Universal Kimograph; Harvard Apparatus). Muscle force analysis was conducted at a constant room temperature of 25°C to 27°C, and the gastrocnemius muscle was covered with mineral oil (Sigma-Aldrich) to prevent muscle drying during the muscle force determination. For each animal, the muscle force was determined in both right (injured) and left (control) gastrocnemius muscle.

Repeated isometric muscle twitches were elicited through electrical stimulation of gastrocnemius muscle at

a frequency of 1 Hz (5 pulses) and a voltage of 5 V. Twitch response was analyzed in all rats by measuring maximal twitch force (TwF), contraction time (CT), and half-relaxation time (HRT). Following twitch stimulation, maximum tetanus force (TetF) was induced by a train of stimuli with a frequency of 100 Hz, a pulse width of 0.1 milliseconds, and a voltage of 5 V.

After completion of the muscle force measurements, the animals were euthanized by anesthetic overdose. Gastrocnemius muscles were excised, weighed, and immediately frozen in 2-methylbutane (Alfa Aesar), which was previously supercooled in liquid nitrogen, and were stored at -80°C until further analysis.

Histological and Immunofluorescence Analysis

Frozen gastrocnemius muscles were transversely sectioned (10 μ m thick) by use of a Cryotome (Leica) at below -20°C and mounted on poly-L-lysine glass slides (VWR). Consecutive frozen sections were used for histological and immunofluorescence analysis. For histological analysis, muscle sections were stained with hematoxylin-eosin (1 minute hematoxylin and 15 seconds eosin), dehydrated with graded ethanol (VWR) solutions (ethanol 50%, ethanol 70% twice, ethanol 90% twice, ethanol 100% twice, 1 minute each), cleared in xylene (5 seconds), and mounted with DPX mounting medium and a coverslip (VWR). Harris hematoxylin solution was purchased from Casa Álvarez, and the eosin solution was prepared by dissolving 0.5 g Eosin Yellowish (Panreac) in 100 mL of water with 200 μ L of glacial acetic acid (Sigma-Aldrich). For immunofluorescence analysis, frozen muscle sections were fixed in cold (-20°C) acetone (Sigma-Aldrich) for 5 minutes, blocked in PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) for 10 minutes at room temperature, and incubated with primary antibodies diluted 1:100 in phosphate-buffered saline (PBS) + 3% BSA for 16 hours in a humid chamber at 4°C. The primary antibodies used were rabbit anti-collagen I (Abcam) and mouse developmental myosin heavy chain (dMHC; Novocastra). Samples were washed 3 times in PBS and incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor 568 anti-mouse or Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Invitrogen) diluted 1:1000 in PBS + 3% BSA in a dark humid chamber for 1 hour at room temperature. Finally, slides were washed 3 times with PBS and mounted by use of a coverslip and Fluoromount-G containing DAPI (Southern Biotech) mounting medium.

Analysis of Muscle Fiber Cross-sectional Area, dMHC, and Collagen I Expression

To evaluate the degree of muscle regeneration and fibrosis in the injured area of gastrocnemius muscle samples, we measured the size of newly formed muscle fibers as well as the expression levels of the muscle regeneration marker dMHC and the fibrosis marker collagen I in microphotographs obtained by immunofluorescence analysis. dMHC protein is a well-known marker of muscle regeneration^{11,36} that is highly expressed during embryogenesis but, in adult muscle, is detected only in newly formed myofibers.¹¹ After muscle

injury, dMHC expression is commonly detected at days 2 to 3 after injury and progressively increases up to day 14 when its expression gradually declines due to the successive replacement by adult muscle myosin isoforms.^{11,12,36,37}

The cross-sectional area (CSA) of newly formed muscle fibers was measured in collagen I immunofluorescence microphotographs. Three images were randomly selected within the injured area of gastrocnemius muscle cross sections by use of a BX-61 microscope (Olympus) equipped with a DP72 camera (Olympus) and CellSens Digital Imaging software (version 1.9). For CSA determination, a total of 200 to 300 fibers per muscle in each group were counted and measured after collagen I immunostaining of muscle samples. Areas of muscle fibers were calculated with Image J software (version 1.46; National Institutes of Health), based on a ratio of calibrated pixels to actual size (μm).

dMHC expression levels were analyzed by measuring the average signal intensity in dMHC immunofluorescence microphotographs. The signal intensity was determined by use of Image J software (version 1.46), and values presented are an average between 3 and 4 images from every muscle sample. dMHC levels are presented as the percentage of dMHC-positive area respective to the total area of the image.

The degree of fibrosis was evaluated in collagen I immunofluorescence images by determining the area of collagen I respective to the total area in microphotographs. The percentage of collagen I area was measured with the Threshold Color plugin for Image J software (version 1.46) as an average of 3 or 4 images from every muscle sample. The same threshold set was used for all samples analyzed.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics version 20.0 (IBM). The normality and homoscedasticity of the data were studied for each parameter to apply the correct statistical method (parametric or nonparametric). The Shapiro-Wilk test was used to verify the normal distribution of the data.

Paired Student *t* tests were used to determine statistical significance in comparisons of TetF, TwF, CT, and HRT parameters between right (injured) and left (control) gastrocnemius muscle of every animal. The power analysis for the paired *t* test was automatically performed to detect a minimum difference in means of 0.8 with an alpha value of .05.

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by pairwise multiple comparison procedures (post hoc Holm-Sidak test) was performed to assess the differences in body weight, muscle weight, and dMHC expression between the 5 groups of animals.

A Kruskal-Wallis test was used to evaluate statistical significance in nonparametric comparisons between the different groups of animals for TetF (expressed as percentage of injured vs control muscle), TwF (also expressed as percentage of injured vs control muscle), myofiber CSA, or collagen I percentage. In case of significant differences, a Mann-Whitney *U* test was used to compare the different groups.

TetF and TwF were normalized to the individual gastrocnemius muscle mass and expressed in mN/g. Differences were considered significant with a *P* value less than .05.

Data are presented as mean \pm SD for the analysis of platelets and white blood cells in PRP samples, body and gastrocnemius muscle weight, individual gastrocnemius muscle force parameters, and myosin heavy chain (MHCd) levels determination. TetF of the injured vs contralateral control muscles and the percentage of intramuscular collagen I are presented as median \pm SD. The CSA values are presented as median \pm SEM.

RESULTS

Platelet Concentration in PRP and Whole Blood

The number of platelets was determined both in whole blood and in PRP samples prepared immediately after blood collection. The number of platelets in PRP solution was $3.73 \pm 0.25 \times 10^6$ platelets per microliter (PLTs/ μL), which represents a 4.8-fold increase compared with the platelet concentration in whole blood samples ($0.78 \pm 0.11 \times 10^6$ PLTs/ μL). The presence of white blood cells in PRP samples ($0.004 \pm 0.0054 \times 10^3/\mu\text{L}$) was drastically reduced after the PRP purification process, since whole blood samples showed an original white blood cell count of $6.9 \pm 1.47 \times 10^3/\mu\text{L}$. Thus, PRP samples obtained should be considered as concentrated in platelets and leukocyte-poor PRP.

Muscle and Body Mass

As indicated in Table 2, no significant differences in body weight were observed between the 5 groups of animals at the beginning or at the end of the experiments. In addition, no significant differences were detected in gastrocnemius muscle mass either between the injured and the control muscle in each animal or between the animals in the 5 groups of treatments (Table 2).

Effect of Treatments on Gastrocnemius Muscle Force

The effect of the different treatments on muscle force recovery was determined by comparing the TetF percentage of injured versus contralateral uninjured muscle among the different groups of animals. As shown in Figure 2, untreated and saline-injected animals showed an approximate 30% decrease in TetF of the injured versus healthy contralateral leg: $72.7\% \pm 5.8\%$ ($P < .001$) and $73.2\% \pm 10\%$ ($P < .01$), respectively. The treatments (PRP, Exer, and PRP-Exer) produced an increase of the injured muscle TetF when compared with untreated or saline-treated groups of animals. Exercise-based therapy (Exer group) demonstrated the strongest effect ($95.2\% \pm 4.8\%$ of TetF of the injured vs healthy contralateral) in TetF improvement (31% increase vs untreated animals), whereas the treatments based on PRP intramuscular injection and the combination of PRP administration and exercise showed a smaller TetF increase (18% and 20%, respectively). Muscle forces in the PRP and PRP-Exer groups were $85.9\% \pm 8.1\%$ and $87.4\% \pm 4.8\%$, respectively, after 2 weeks of treatment (Figure 2).

Exercise-treated animals (the Exer group) showed a significant TwF increase of the percentage of muscle force of

TABLE 2
Body Weight and Gastrocnemius Muscle Mass^a

Treatment Group	Body Weight		Final Gastrocnemius Mass	
	Initial	Final		
Untreated	272.6 ± 26.3	321.3 ± 32.3	Control	2.0 ± 0.2
			Injured	2.0 ± 0.3
Saline	296.2 ± 22.7	333.3 ± 24.9	Control	2.0 ± 0.2
			Injured	2.2 ± 0.1
PRP	285.0 ± 14.7	331.9 ± 15.2	Control	2.1 ± 0.1
			Injured	2.0 ± 0.1
PRP-Exer	286.7 ± 16.2	336.7 ± 13.6	Control	2.3 ± 0.1
			Injured	2.2 ± 0.1
Exer	269.0 ± 16.0	314.0 ± 14.1	Control	2.1 ± 0.1
			Injured	2.0 ± 0.1

^aValues are presented in grams, as mean ± SD. Anesthetized animals were weighed just before induction of gastrocnemius muscle injury and at the end of the treatments. Right (injured) and left (control) gastrocnemius muscles were excised and weighed from all the animals (n = 8 per group) just before euthanasia at the end of the treatment period. Exer, group treated with exercise only; PRP, group treated with platelet-rich plasma; PRP-Exer, group treated with platelet-rich plasma and exercise.

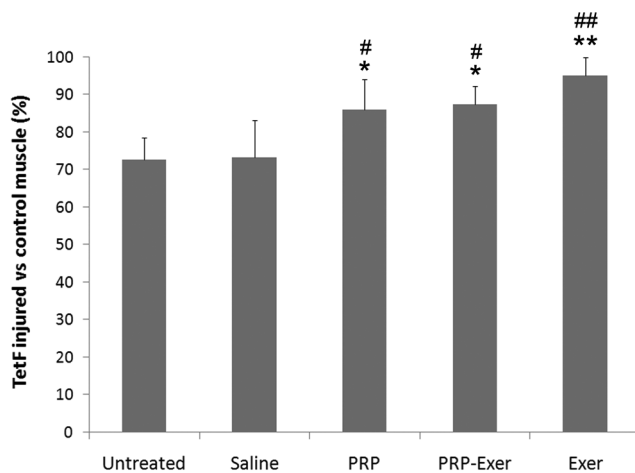


Figure 2. Measurement of gastrocnemius muscle force after treatments. Gastrocnemius muscle force was measured at the end of the treatments (14 days after injury). Data represent maximum tetanus force (TetF) normalized to muscle mass for the injured vs contralateral control muscles (n = 8). Values are presented as median ± SD. **P* < .01 vs untreated group, ***P* < .001 vs untreated group, #*P* < .05 vs saline group, ##*P* < .01 vs saline group. Exer, group treated with exercise only; PRP, group treated with platelet-rich plasma; PRP-Exer, group treated with platelet-rich plasma and exercise.

injured versus contralateral healthy muscle compared with untreated (23%), saline-treated (26%), and PRP (23%) groups (Table 3). CT and HRT did not show significant differences between control and injured gastrocnemius muscles (Table 3).

Analysis of Muscle Regeneration and Fibrosis

An increase in myofiber CSA was found in rats in the PRP, PRP-Exer, and Exer groups in comparison to untreated or

saline-injected animals (Figure 3, A and B); the Exer group showed the largest increase in size ($482 \pm 15.2 \mu\text{m}^2$) compared with the other 4 groups (*P* < .001). The PRP-Exer group showed larger myofiber CSA ($388.8 \pm 16.5 \mu\text{m}^2$) than untreated, saline, and PRP groups (*P* < .001), whereas the PRP group ($286.7 \pm 19.6 \mu\text{m}^2$) showed significant differences only when compared with untreated and saline-injected animals ($195 \pm 10.2 \mu\text{m}^2$ [*P* < .001] and $219.5 \pm 3.9 \mu\text{m}^2$ [*P* < .01], respectively).

The degree of fibrosis was evaluated by the expression and deposition of collagen I in muscle samples after 2 weeks of treatment (Figure 3, A and C). The PRP, PRP-Exer, and Exer groups showed significantly lower collagen I deposition ($35.3\% \pm 4.7\%$, $29.3\% \pm 2.5\%$, and $26.1\% \pm 1.6\%$ of collagen I area vs total area, respectively) when compared with untreated and saline groups ($44.2\% \pm 4.5\%$ and $41.9\% \pm 3.2\%$ of collagen I area vs total area, respectively). Remarkably, the 2 groups of animals treated with exercise showed the strongest reduction of collagen I levels (approximately 34% and 41% decrease in PRP-Exer and Exer groups, respectively), whereas the PRP group showed only a 20% of decrease in collagen I levels compared with untreated and saline groups. No significant differences in collagen I levels were found between untreated and saline-injected animals.

The presence of newly formed myofibers during the regeneration process was analyzed by immunofluorescence of dMHC expression levels at 2 weeks after injury (Figure 4A). dMHC expression was quantified as the percentage of dMHC-positive area versus total muscle area in microphotographs (Figure 4B). The number of dMHC-positive regenerating myofibers was significantly lower in gastrocnemius muscle of animals after treatment with exercise ($10.2\% \pm 2.3\%$ and $8.3\% \pm 2.3\%$ in PRP-Exer and Exer groups, respectively) when compared with untreated or saline groups ($15.6\% \pm 2.8\%$ and $15.5\% \pm 1.6\%$, respectively). Thus, exercise treatment after injury reduced the dMHC levels around 35% (*P* < .01) and 47% (*P* < .001)

TABLE 3
Maximum Tetanus Force, Twitch Force, and Twitch Time Parameters^a

Treatment Group		TetF, mN/g	TwF, mN/g	TwF, I/C%	CT, ms	HRT, ms
Untreated	Control	589.2 ± 74.6	387.7 ± 105.8	74.9 ± 8.1 ^b	14.0 ± 4.2	28.7 ± 9.1
	Injured	422.8 ± 64.3 ^c	287.5 ± 73.3 ^c		13.0 ± 3.7	26.9 ± 10.1
Saline	Control	569.4 ± 154.2	417.9 ± 86.0	73.2 ± 3.9 ^b	14.6 ± 1.7	27.6 ± 2.0
	Injured	414.3 ± 61.6 ^d	306.5 ± 66.8 ^c		13.9 ± 2.0	24.3 ± 3.1
PRP	Control	590.9 ± 113.6	435.1 ± 154.4	75.3 ± 12.3 ^b	16.5 ± 2.6	28.7 ± 4.2
	Injured	505.1 ± 72.9 ^d	329.1 ± 141.2 ^c		14.5 ± 3.3	27.8 ± 6.7
PRP-Exer	Control	593.0 ± 75.6	421.6 ± 92.0	79.2 ± 19.6	14.4 ± 3.8	25.8 ± 4.2
	Injured	518.9 ± 68.7 ^d	324.7 ± 70.9 ^e		12.1 ± 2.1	23.8 ± 2.7
Exer	Control	567.5 ± 123.4	386.3 ± 106.5	92.4 ± 13.5	14.4 ± 2.4	32.1 ± 5.8
	Injured	522.3 ± 103.6 ^d	363.3 ± 130.1		13.2 ± 2.5	32.7 ± 6.4

^aValues are presented as mean ± SD. Right (injured) and left (control) gastrocnemius muscle force parameters were evaluated at the end of the treatments (14 days after injury) in all animals (n = 8 per group). CT, contraction time; Exer, group treated with exercise only; HRT, half-relaxation time; I/C%, percentage of muscle force of injured vs contralateral healthy muscle; PRP, group treated with platelet-rich plasma; PRP-Exer, group treated with platelet-rich plasma and exercise; TetF, tetanic force; TwF, twitch force.

^b*P* < .05 compared with Exer group.

^c*P* < .001 compared with control muscle.

^d*P* < .01 compared with control muscle.

^e*P* < .05 compared with control muscle.

in PRP-Exer and Exer groups, indicating that the replacement of the embryonic-developmental myosin isoform by mature muscle myosin isoforms in regenerating myofibers is accelerated by the exercise-based therapy. However, although the PRP treatment also showed a reduction in dMHC levels (13.2% ± 1.4%), the data did not reach statistical significance.

DISCUSSION

In the present work, we designed a classic 2 × 2 experimental study to evaluate the potential benefits on muscle healing of the administration of a single US-guided intramuscular PRP injection 24 hours after injury, a progressive pattern of daily treadmill exercise, or the combination of both treatments. Interestingly, we found a significant improvement in muscle force together with an increase in the size of regenerating myofibers in all treated animals; the exercise-based therapy showed the strongest beneficial effects (almost 30% improvement in muscle strength and 2.5-fold of increase in myofiber size) but rather strikingly was adversely affected by the combination with PRP injection. Our findings corroborate previously reported data regarding 2 different types of exercise, swimming and running, which concluded that postinjury exercise is better than no mobility and that immediate onset of exercise is preferable to a delayed onset.¹⁷

Because one of the major concerns in muscle healing is often related to excessive production of connective tissue and scar formation, which considerably delay the recovery time,²⁴ the development of therapies directed to prevent excessive collagen I expression and deposition could represent promising approaches for the treatment of musculoskeletal injuries.^{9,20} Our data revealed that exercise- and PRP-based treatments not only improved muscle force and stimulated muscle fiber growth but also demonstrated a statistically

significant antifibrotic effect as stated by the decrease in collagen I deposition in injured muscle areas. The antifibrotic effect was the largest in the exercise-therapy group. Our results corroborate previously reported data in a laceration injury model, which evidenced that stretching exercise improves muscle regeneration and prevents fibrosis after injury.²³ Although the effect of PRP on preventing fibrosis was lower than the effect of exercise-based therapy, it is worth pointing out that we did find an antifibrotic effect of intramuscular PRP injection since the role of PRP in the regulation of fibrosis is still controversial. PRP has been involved in the induction of a myofibroblast phenotype that could lead to tissue fibrosis and scar formation,³¹ since PRP also contains tumor growth factor β1 (TGF-β1), a key factor in the development of fibrosis.⁶ In contrast, *in vitro* studies have demonstrated that PRP down-regulates fibrotic cytokines, increases muscle cell proliferation, and contributes to a significant myogenic shift during differentiation, especially if combined with TGF-β inhibitors such as decorin.^{25,26,30,32,35}

By evaluating the expression levels of the dMHC muscle regeneration marker, we also found compelling evidence that muscle healing is accelerated by exercise-based therapy.^{11,36} Exercise-treated animals revealed a strong reduction in dMHC levels, indicating a faster replacement of dMHC isoform by mature MHC isoforms, but an adverse effect was detected when exercise was combined with PRP administration. Similar results have been reported in the form of an increase of regenerating myofiber CSA and an accelerated shift from the neonatal MHC to adult MHC isoforms in regenerating muscles at day 10 after cryoinjury rat model upon leucine supplementation.⁴¹

The exact molecular mechanism for our unexpected outcome is not known. Large regions of the surviving parts of the injured skeletal muscle are devoid of vascular supply for an extensive period of time after the injury.^{22,24} The active use of injured skeletal muscle in early, active rehabilitation will trigger substantial hypoxia in the injured

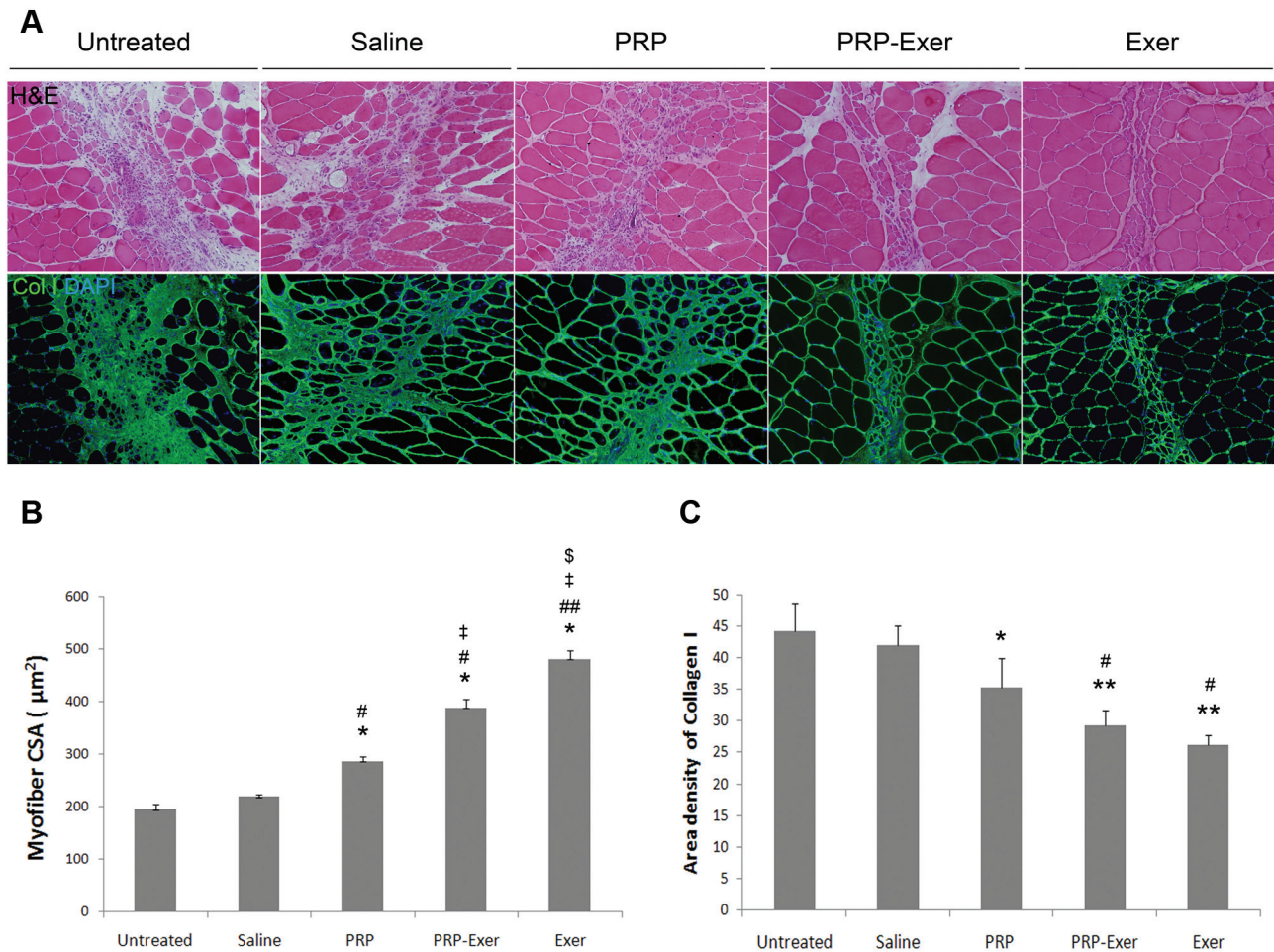


Figure 3. Analysis of the cross-sectional area of myofibers and degree of fibrosis in rat gastrocnemius muscle. (A) Representative images ($n = 8$ for each treatment) show hematoxylin-eosin stained gastrocnemius muscle cross sections (upper panel) and immunofluorescence analysis for collagen I (lower panel) after treatments (14 days after injury). Images show ($\times 100$) microphotographs for all panels. (B) Cross-sectional area (CSA) of newly formed muscle fibers was measured in collagen I immunofluorescence microphotographs. Three images were randomly selected within the injured area of gastrocnemius muscle cross sections by use of a BX-61 microscope equipped with a DP72 camera and CellSens Digital Imaging software. The CSA values of 200-300 fibers per muscle were calculated with Image J software, based on a ratio of calibrated pixels to actual size (μm). Values are presented as median \pm SEM. $*P < .001$ vs untreated group, $\#P < .01$ vs saline group, $\#\#\#P < .001$ vs saline group, $\dagger P < .001$ vs PRP group, $\S P < .001$ vs PRP-Exer group. (C) The degree of fibrosis was evaluated in collagen I immunofluorescence images by determining the area of collagen I respective to the total area in microphotographs. The percentage of collagen I area was measured by using the Threshold Colour plugin for Image J software as an average between 3 and 4 images in every muscle sample. The same threshold set was used for all samples analyzed. Values are presented as median \pm SD. $*P < .01$ vs untreated and saline groups, $**P < .001$ vs untreated and saline groups, $\#P < .001$ vs PRP group. Exer, group treated with exercise only; PRP, group treated with platelet-rich plasma; PRP-Exer, group treated with platelet-rich plasma and exercise.

skeletal muscle fibers. Hypoxia induces the expression of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) in all surviving mammalian cells. HIF-1 α , in turn, induces the expression of more than 80 growth factors and chemokines needed for angiogenesis.^{3,49} Thus, the hypoxia-induced growth factors and chemokines in injured skeletal muscle exposed to active rehabilitation could account for some of the growth factors delivered in PRP. This view is supported by previous studies which showed that the accelerated and enhanced skeletal muscle regeneration by early active

rehabilitation is related to earlier and more pronounced induction of angiogenesis in the injured area.²⁴

An alternative plausible explanation for the reported outcome could be related to the fact that cells respond to mechanical loading by secreting a large number of growth factors that stimulate their regeneration in autocrine or paracrine fashion.²⁷⁻²⁹ Thus, it is highly plausible that some of the growth factors in PRP injections could be replaced by natural mechanotransduction-induced expression of the same growth factors. In this context, one also needs to emphasize that the

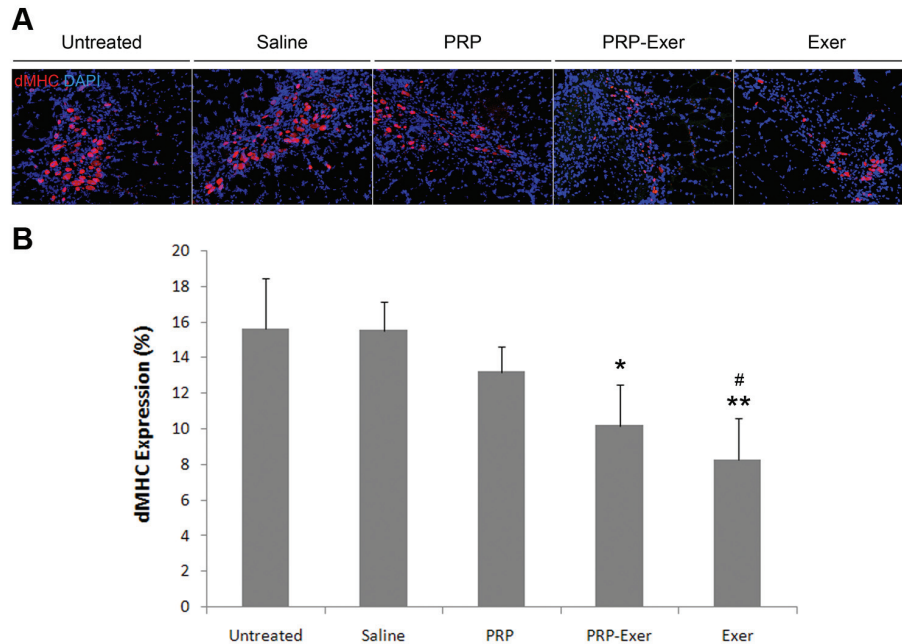


Figure 4. Analysis of developmental myosin heavy chain (MHCd) expression levels in rat gastrocnemius muscle. (A) Representative images ($n = 8$ for each treatment) show immunofluorescence analysis for MHCd after treatment (14 days after injury) in gastrocnemius muscle cross sections. Images show ($\times 100$) microphotographs for all panels. (B) MHCd expression levels were analyzed by measuring the average signal intensity in MHCd immunofluorescence microphotographs. The signal intensity was determined by use of Image J software, and values presented are an average between 3 and 4 images from every muscle sample. MHCd levels are presented as the percentage of MHCd-positive area respective to the total area of the image. Values are presented as mean \pm SD. * $P < .01$ vs untreated and saline groups, ** $P < .001$ vs untreated and saline groups, # $P < .01$ vs PRP group. Exer, group treated with exercise only; PRP, group treated with platelet-rich plasma; PRP-Exer, group treated with platelet-rich plasma and exercise.

mechanical loading placed on injured skeletal muscle by early active rehabilitation is crucial to restore the mechanical integrity of the injured skeletal muscle.^{24,27} Mechanical loading is vital for the expression of strong adhesion molecules between the regenerating skeletal muscle and surrounding matrix, and this restores the mechanical strength of the injured tissues faster than a normal sedentary lifestyle or treatment with immobilization.^{28,29,33,34} It is possible that a sustained release of growth factors from platelets after PRP injection could interfere in the process of regenerating skeletal muscle fibers with the natural mechanotransduction signal provided by early active rehabilitation during the repair. As the sustained release of growth factors from platelets is not controlled temporally, it is theoretically possible that the PRP-derived growth factors provide opposing stimuli (like proliferation) that work against the stimulus provided by mechanical loading (differentiation or strong adhesion) at certain point of regeneration process. These scenarios could provide the molecular explanations why PRP fails to provide any therapeutic advantage for injured skeletal muscle when combined with early active rehabilitation.

Here we have addressed the individual effects of early active rehabilitation and PRP injection, as well as their potential interaction, in a well-characterized experimental skeletal muscle injury model that closely mimics injuries seen in human athletes. We conclude that both exercise-

and PRP-based therapies have a beneficial effect on muscle healing in surgically induced muscle injury in rats. Strikingly, our study shows that although both PRP treatment and an early active rehabilitation protocol individually enhanced the repair of the injured skeletal muscle, the outcome of the early active rehabilitation was adversely affected by the PRP injection when these 2 therapies were combined. This finding might explain why PRP therapies have failed in RCTs in which athletes have adhered to postinjection rehabilitation protocols based on the principle of early, active mobilization. It is worth mention that the PRP product used in our study is a platelet-rich and leukocyte-poor PRP, which is comparable with the PRP products used in the 2 RCTs reporting negative outcomes for PRP.^{18,45} Even though further investigation is required, these therapeutic approaches could open new avenues for the treatment of human skeletal muscle injuries and could be considered as potential evidence-based approaches for the design of optimal therapeutic practices in sports medicine.

CONCLUSION

Our results demonstrate beneficial effects of an early active rehabilitation protocol or a single intramuscular PRP injection on muscle recovery in a rat injury model

that imitates sports-related muscle lesions in athletes. We show here that the early, active rehabilitation protocol alone provided the best outcome after the injury, and PRP, when given alone, also provided substantial therapeutic effect; however, no synergistic effect was observed when both treatments were combined, suggesting that PRP does not add any beneficial effect to exercise-based therapy. This finding is in accordance with the failure of PRP therapies in recently reported RCTs in which athletes were subjected to postinjection rehabilitation protocols based on the principle of early, active mobilization.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Marta Rosal and Alejandro Rojo from the Animal Facility Unit of Vall d'Hebron Institut de Recerca, Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain), for their valuable technical assistance.

A Video Supplement for this article is available online.

REFERENCES

1. A Hamid MS, Mohamed Ali MR, Yusof A, George J, Lee LP. Platelet-rich plasma injections for the treatment of hamstring injuries: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* 2014;42(10):2410-2418.
2. Andia I, Abate M. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(7):987-999.
3. Beaudry M, Hidalgo M, Launay T, Bello V, Darribère T. Regulation of myogenesis by environmental hypoxia. *J Cell Sci.* 2016;129(15):2887-2896.
4. Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001;9(4):227-237.
5. Bernuzzi G, Petraglia F, Pedrini MF, et al. Use of platelet-rich plasma in the care of sports injuries: our experience with ultrasound-guided injection. *Blood Transfus.* 2014;12(suppl 1):s229-s234.
6. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest.* 1992;90(1):1-7.
7. Borrione P, Grasso L, Chierito E, et al. Experimental model for the study of the effects of platelet-rich plasma on the early phases of muscle healing. *Blood Transfus.* 2014;12(suppl 1):s221-s228.
8. Bubnov R, Yevseenko V, Semeniv I. Ultrasound guided injections of platelets rich plasma for muscle injury in professional athletes: comparative study. *Med Ultrason.* 2013;15(2):101-105.
9. Chan Y-S, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med.* 2005;33(1):43-51.
10. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84(1):209-238.
11. Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2010;16(8):906-914.
12. Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella R, et al. A new surgical model of skeletal muscle injuries in rats reproduces human sports lesions. *Int J Sports Med.* 2016;37(3):183-190.
13. Delos D, Leineweber MJ, Chaudhury S, Alzoobaee S, Gao Y, Rodeo SA. The effect of platelet-rich plasma on muscle contusion healing in a rat model. *Am J Sports Med.* 2014;42(9):2067-2074.
14. Denapoli PMA, Stilhano RS, Ingham SJM, Han SW, Abdalla RJ. Platelet-rich plasma in a murine model: leukocytes, growth factors, FLT-1, and muscle healing. *Am J Sports Med.* 2016;44(8):1962-1971.
15. Dimauro I, Grasso L, Fittipaldi 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):e102993.
16. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med.* 2009;37(11):2259-2272.
17. Gregory TM, Heckmann RA, Francis RS. The effect of exercise on the presence of leukocytes, erythrocytes and collagen fibers in skeletal muscle after contusion. *J Manipulative Physiol Ther.* 1995;18(2):72-78.
18. Hamilton B, Tol JL, Almusa E, et al. Platelet-rich plasma does not enhance return to play in hamstring injuries: a randomised controlled trial. *Br J Sports Med.* 2015;49(14):943-950.
19. Hammond JW, Hinton RY, Curl LA, Muriel JM, Lovering RM. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *Am J Sports Med.* 2009;37(6):1135-1142.
20. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(5):822-832.
21. Hudgens JL, Sugg KB, Grekin JA, Gumucio JP, Bedi A, Mendias CL. Platelet-rich plasma activates proinflammatory signaling pathways and induces oxidative stress in tendon fibroblasts. *Am J Sports Med.* 2016;44(8):1931-1940.
22. Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.* 1991;23(7):801-810.
23. Hwang JH, Ra YJ, Lee KM, Lee JY, Ghil SH. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Arch Phys Med Rehabil.* 2006;87(1):20-26.
24. Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33(5):745-764.
25. Järvinen TAH, Prince S. Decorin: a growth factor antagonist for tumor growth inhibition. *Biomed Res Int.* 2015;2015:654765.
26. Järvinen TAH, Ruoslahti E. Targeted antiscarring therapy for tissue injuries. *Adv Wound Care.* 2013;2(2):50-54.
27. Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):332-337.
28. Kääriäinen M, Liljamo T, Pelto-Huikko M, Heino J, Järvinen M, Kalimo H. Regulation of alpha7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration. *Neuromuscul Disord.* 2001;11(4):360-369.
29. Kääriäinen M, Nissinen L, Kaufman S, et al. Expression of alpha7 beta1 integrin splicing variants during skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol.* 2002;161(3):1023-1031.
30. Kelc R, Trapecar M, Gradisnik L, Rupnik MS, Vogrin M. Platelet-rich plasma, especially when combined with a TGF-β inhibitor promotes proliferation, viability and myogenic differentiation of myoblasts in vitro. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117302.
31. Kushida S, Kakudo N, Suzuki K, Kusumoto K. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. *Ann Plast Surg.* 2013;71(2):219-224.
32. Kvist M, Hurme T, Kannus P, et al. Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *Am J Sports Med.* 23(3):359-364.
33. Lehto M, Duance VC, Restall D. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury: an immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J Bone Joint Surg Br.* 1985;67(5):820-828.
34. Lehto M, Sims TJ, Bailey AJ. Skeletal muscle injury—molecular changes in the collagen during healing. *Res Exp Med (Berl).* 1985;185(2):95-106.
35. Li H, Hicks JJ, Wang L, et al. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor β1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials.* 2016;87:147-156.
36. Marotta M, Sarria Y, Ruiz-Roig C, Munell F, Roig-Quilis M. Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(9-10):707-718.

37. Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestri R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(4):C1128-C1138.
38. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(4):CD010071.
39. Negishi S, Li Y, Usas A, Fu FH, Huard J. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. *Am J Sports Med*. 2005;33(12):1816-1824.
40. Pas HIMFL, Reurink G, Tol JL, Weir A, Winters M, Moen MH. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: an updated systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med*. 2015;49(18):1197-1205.
41. Pereira MG, Silva MT, Carlassara EOC, et al. Leucine supplementation accelerates connective tissue repair of injured tibialis anterior muscle. *Nutrients*. 2014;6(10):3981-4001.
42. Pruna R, Til L, Artells R. Could single nucleotide polymorphisms influence on the efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of sport injuries? *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):63-65.
43. Reider B. Circumventing biology. *Am J Sports Med*. 2016;44(8):1927-1930.
44. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, et al. Platelet-rich plasma injections in acute muscle injury. *N Engl J Med*. 2014;370(26):2546-2547.
45. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, 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. *Br J Sports Med*. 2015;49(18):1206-1212.
46. Rodeo SA. Biologic approaches in sports medicine: potential, perils, and paths forward. *Am J Sports Med*. 2016;44(7):1657-1659.
47. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008;1(3-4):165-174.
48. Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*. 2009;39(5):345-354.
49. Semenza GL. Targeting hypoxia-inducible factor 1 to stimulate tissue vascularization. *J Invest Med*. 2016;64(2):361-363.
50. Woolf AD, Pflieger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ*. 2003;81(9):646-656.
51. Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of platelet-rich plasma on intestinal anastomotic healing in rats: PRP concentration is a key factor. *J Surg Res*. 2012;173(2):258-266.

Artículo III

Chondroitin sulfate and glucosamine administration improves muscle regeneration in rats: a new potential treatment for sports medicine?

Contreras-Muñoz P.^{1,2}, Montell E.³, Torrent A.³, Torrella JR.⁴, De la Varga M.¹, Viscor G.⁴, Vergés J.³, RodasG.^{1,5}, Marotta M.^{1,2}.

Enviado a International Journal of Sports Medicine Journal y actualmente en revisión.

1 Leitat Foundation, Leitat Technological Center. Carrer de la Innovació 2, Terrassa, 08225, Barcelona, Spain.

2 Bioengineering, Cell therapy and Surgery in Congenital Malformations Laboratory. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

3 Pre-Clinical R&D Area, Pharmascience Division, Bioibérica S.A.U., Barcelona, Spain.

4 Physiology department, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

5 Medical Services, Futbol Club Barcelona, Ciutat Esportiva Futbol Club Barcelona, Av. del Sol s/n, 08790 Sant Joan Despí, Barcelona, Spain

Chondroitin sulfate and glucosamine administration improves muscle regeneration in rats: a new potential treatment for muscle injuries?

Paola Contreras-Muñoz^{1,2}, Eulàlia Montell³, Anna Torrent³, Ramón Torrella⁴, Meritxell DelaVarga¹, Ginés Viscor⁴, Josep Vergés³, Gil Rodas^{1,5}, Mario Marotta^{1,2,*}.

¹Leitat Foundation, Leitat Technological Center. Carrer de la Innovació 2, Terrassa, 08225, Barcelona, Spain.

²Bioengineering, Cell therapy and Surgery in Congenital Malformations Laboratory. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Pre-Clinical R&D Area, Pharmascience Division, Bioibérica S.A.U., Barcelona, Spain.

⁴Physiology department, Universitat de Barcelona (UB), Barcelona, Spain.

⁵Medical Services, Futbol Club Barcelona, Ciutat Esportiva Futbol Club Barcelona, Av. Onze de Setembre, s/n 08790 Sant Joan Despí, Barcelona, Spain

*To whom correspondence should be addressed: Dr. Mario Marotta. Leitat Technological Center, MuscleTech Network, C/Innovació n^o 2, 08225, Terrassa (Barcelona) Spain. e-mail: mmarotta@leitat.org

RUNING TITLE: CS+GLU promote skeletal muscle regeneration.

KEYWORDS: Chondroitin sulfate; glucosamine hydrochloride; skeletal muscle injury; muscle regeneration; anti-fibrotic effect; muscle injury rat model.

ABSTRACT

Skeletal muscle injuries are the most common sports-related injuries and a major concern in sports medicine. There is an acute need to develop novel therapeutic strategies due to the lack of effective treatments on muscle healing. Our aim was to evaluate the beneficial effects of the combination of chondroitin sulfate (CS) and glucosamine (GLU) hydrochloride administration (both compounds used for the symptomatic osteoarthritis (OA) treatment) on muscle healing in a recently established rat model of skeletal muscle injury which reproduces the lesions seen in human athletes. Animals (24 male 8-weeks-old Wistar rats) were assigned to 4 groups. Injured rats (medial gastrocnemius injury) received daily treatment for 3 weeks with CS+GLU by oral gavage administration (140 and 175 mg/kg of CS and GLU, respectively) or intraperitoneal injection (400 and 500 mg/kg, respectively). Healthy and untreated animals were used as controls. Oral ($P<0.01$) and i.p. ($P<0.05$) administration induced an increase of more than 30% in CS intramuscular deposition. CS+GLU administration stimulated the growth of newly formed regenerating myofibers (1.25- and 1.99-fold of increase ($P<0.001$) in the cross-sectional area after oral and i.p. administration, respectively), that was accompanied by a 16 % ($P<0.01$) and 21 % ($P<0.001$) of improvement in skeletal muscle force. Both treatments also showed a clear anti-fibrotic effect by reducing 21% (oral, $P<0.05$) and 28% (i.p., $P<0.01$) the intramuscular collagen-I deposition. Therefore, the combined CS+GLU treatment improved muscle healing and force recovery of the injured skeletal muscle in rats, thus suggesting an important role of these products as potential new therapies for the treatment of muscle injuries in sports medicine. Furthermore, these results could help clinicians to account effects of comorbidities on musculoskeletal diseases and OA, as well as to consider new treatment options that show potential in both conditions.

INTRODUCTION

Chondroitin sulfate (CS) and glucosamine (GLU) are both natural compounds from biological origin, present in the extracellular matrix (ECM) surrounding cells, especially in the cartilage, skin, blood vessels, ligaments, tendons and brain, where they constitute an essential component of proteoglycans (PGs) [41]. Multiple controlled clinical trials in patients with osteoarthritis (OA) have reported clinical benefits of both therapies to reduce pain, joint swelling and effusion, improve joint function and delay the progression of the disease, with an excellent safety profile [48]. Accordingly, CS and GLU have been classified as Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis (SYSADOA) and a structure/disease-modifying anti-osteoarthritis drug (S/DMOAD). Likewise, the European League Against Rheumatism (EULAR) [29], the Pan American League of Associations of Rheumatology (PANLAR) [38] and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) [5] support the usefulness of CS and GLU as OA treatments in their last recommendation guidelines.

The mechanisms of action of both products for the treatment of OA have been largely studied [7–10,36,41,44,45]. In humans, the efficacy of the combination CS and GLU in the treatment of knee OA has been suggested in different clinical studies. The Glucosamine/Chondroitin Arthritis Intervention Trial (GAIT study) suggested that the combination of GLU and CS may be effective in the subgroup of patients with moderate-to-severe knee pain [12]. These promising results were confirmed by Hochberg and colleagues in the MOVES (Multicentric Osteoarthritis Intervention Study with SYSADOA) trial [21]. The MOVES trial showed a comparable efficacy to celecoxib in reducing pain, stiffness, functional limitation and joint swelling/effusion after 6 months in patients with painful knee OA, with a good safety profile. Afterwards, Pelletier et al., using data from participants enrolled in the progression cohort of the Osteoarthritis Initiative (OAI), demonstrated the beneficial effect of the GLU/CS at delaying knee OA structural progression and preventing loss of cartilage volume over 24 months [37].

Despite the beneficial effects of the combined GLU/CS administration for the treatment of OA, the combination of CS and GLU has not been tested as a possible

treatment in skeletal muscle tissue injuries, so its potential therapeutic effects for muscle healing remain still unknown. Musculoskeletal injuries are the most common cause for severe, chronic pain and physical disability affecting hundreds of millions of people around the world and represent a major concern also in sports medicine [2,39,46]. In particular, skeletal muscle lesions caused by traumatic muscle contusion and strain injuries could represent 55% of all acute, sports-related injuries [4,26]. Despite substantial efforts have been dedicated, especially in the field of sports medicine, to the development of new therapeutic strategies leading to the improvement in skeletal muscle healing and functional recovery after muscle injury [27], no effective treatments have been generated so far.

The impairment of biological and mechanical homeostasis is common in orthopedic sports medicine where musculoskeletal tissues are often subjected to excessive stresses and repetitive injuries. Major injuries in athletes result in a high incidence of chronic problems such as osteoarthritis (OA), for which effective treatments are not yet available [43]. It is important to take into account that both skeletal muscle injuries and OA have a multifactorial pathogenesis and share risk factors including genetic predisposition and specific age [1,33]. Although cartilage and muscle tissue have different mechanical functions and are surrounded by other structures that can directly- or indirectly-influence treatment outcomes, their similarities may have clinical implications. Since *in vitro*, *in vivo* and clinical studies support existence of a synergistic effect of CS and GLU [7,12,45], if similar anti-inflammatory and anti-angiogenic and anti-catabolic effects were elicited in skeletal muscle, these combined products may also be useful as adjunct therapy in sports-related injuries.

After a traumatic muscle injury, adult skeletal muscle has the capacity to self-repair by following an orchestrated muscle repair process highly dependent of inductive signals of cytokines and growth factors, which are released by the injured fibers, invading macrophages and inflammatory cells or connective tissue [11,19,20]. Muscle regeneration process can be divided into three overlapping phases [22,23,26,27,32]: 1) Degeneration phase (1-3 days post-injury), characterized by the necrosis of muscle fibers and the ensuing inflammatory reaction; 2) Repair phase (up to 3-4 weeks post-injury), characterized by the phagocytosis of the necrotic tissue, muscle precursor cells activation, generation of new muscle fibers and the

production of a tissue scar; 3) Remodeling phase (3–6 months post-injury), characterized by the reorganization of the muscle fibers and the remodeling of the scar tissue.

There is increasing evidence of the important role of Extracellular matrix (ECM) during muscle development and regeneration, acting as a scaffold for the arrangement of the cells within tissues, as a reservoir of growth factors and promoting muscle cell responses [17,30,31]. Since CS is one of the most important components of ECM [17], which is widely distributed in the ECM and on the surface cell membranes in the form PGs, and based on the beneficial effect of the administration of CS and GLU observed in the treatment of OA, we decided to investigate the potential benefit of administration in the muscle tissue injuries. The aim of the present study was to evaluate the *in vivo* beneficial effects of the CS and GLU administration on muscle healing by using a well-characterized skeletal muscle injury-model in rats which reproduces the injuries seen in human athletes [14].

MATERIALS AND METHODS

Animals, surgery and treatments

Adult (8-week-old) male Wistar rats (Harlan Laboratories Ltd, Horst, The Netherlands) were used as animal model. The total number of animals used in our study was 24. Rats were housed at 22°C to 24°C and maintained on a 12-hour light/dark cycle. Water and food were given ad libitum during the experiments. All procedures were performed in accordance with Spanish (Real Decreto 53/2013) and European (2010/63/UE) legislation and approved by the Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

Surgically-induced skeletal muscle injury was generated just proximal to the myotendinous junction of the medial gastrocnemius muscle in all rats, as previously described [14]. This experimental model reproduces the skeletal muscle injuries observed in the clinical practice in human athletes.

Briefly, rats were anaesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.) before surgical procedure and placed in prone position by the fixation of tail and extremities with adhesive strips to a cork surface exposing the ventral side of the right crus. The muscle injury was generated by using an 18g biopsy needle (Bard® Monopty® Disposable Core Biopsy Instrument, Bard Biopsy Systems, Tempe, USA) with 0.84 mm inner diameter. Transversal biopsy procedure was performed at the myotendinous junction level of the right leg medial gastrocnemius muscle (3 mm from the start of muscle-tendon junction and 2 mm in depth). Post-surgical analgesia (buprenorphine 0.01 mg/kg) was subcutaneously administered to all operated animals.

Rats were randomly divided into four groups (N=6/ group):

1. Healthy Group. No injury was created in these animals.
2. Untreated Group. No treatment was administered after muscle injury.

3. CGo (CS+GLU, oral) Group. The rats were subjected to daily oral gavage administration of CS+GLU solution (140 mg/kg/day of CS and 175 mg/kg/day of GLU hydrochloride dissolved in drinking water) for 3 weeks after muscle injury.

4. CGip (CS+GLU, intraperitoneal) Group. A daily intraperitoneal injection of CS+GLU solution (400 mg/kg/day of CS and 500 mg/kg/day of GLU hydrochloride dissolved in sterile 0.9% Sodium Chloride saline (Baxter, Spain) injection solution) was administered to these animals during 3 weeks after muscle injury.

CS and GLU hydrochloride were pharmacological grade and both were provided by Bioibérica, S.A.U. (Barcelona, Spain). CS was from bovine origin, containing highly purified chondroitin sulfate 4 and 6 in a concentration not less than 98%, and with an average molecular weight of ~15–16 kDa. Other characteristics (viscosity, sulfation sites, etc.) have been previously detailed elsewhere [6].

Measurement of medial gastrocnemius muscle force

The maximum tetanus force (TetF) of the gastrocnemius muscle was recorded in rats (N=6/group) anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (75 mg/kg, i.p.) and xylazine (10 mg/kg, i.p.). Anesthetized animals were placed in a small platform with the knee in a fully extended position and fixed with two needles (in the knee and in the ankle) in order to immobilize the limb. Achilles tendon including the calcaneus was separated from the surrounding tissue leaving the proximal origin, the blood supply, and nerves intact. The Achilles tendon was cut and attached, via a tendon hook stretched with a passive force of 100 mN, to a force transducer (TRI-201 Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain) coupled to a polygraph (Polygraph 2006; Letica Scientific Instruments, Barcelona, Spain). The sciatic nerve was then exposed through a lateral incision on the thigh and connected to an electrode and a stimulator (Universal Kimograph; Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, United States). Muscle force analysis was conducted at a constant room temperature of 25-27°C and gastrocnemius muscle was covered with mineral oil to prevent muscle drying during the recording. The TetF was measured by electrical stimulation of sciatic nerve at a frequency of 100 Hz, 0.1 ms pulse width

and a voltage of 5 V. For each animal, it was determined the TetF in control (non-injured) leg and in surgically-induced injured leg after 2-weeks post-injury.

Histology and Immunofluorescence analysis

Animals were euthanized by intraperitoneal injection of an overdose of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) at 3-weeks after the injury. Gastrocnemius muscles were excised, and immediately frozen in 2-methylbutane (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) previously super-cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. Frozen medial gastrocnemius were transversely sectioned (10µm thick) using a Cryotome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at below -20°C and mounted on Polylysine™ glass slides (VWR, Leuven, Belgium). Consecutive frozen muscle sections were used for histological and immunofluorescence analysis.

For histological analysis, rat skeletal muscle sections were stained with Hematoxylin-Eosin (1 min hematoxylin and 15 seconds eosin), washed in water, dehydrated with graded ethanol solutions (1 min ethanol 50%, 1 min ethanol 70% twice, 1 min ethanol 90%, 1 min ethanol 100% twice) and cleared in xylene (5 seconds). After air-drying for 5 min, the slides were mounted with DPX mounting medium and a coverslip (VWR, Madrid, Spain). Hematoxylin Harris solution was purchased from Casa Álvarez (Casa Álvarez, Madrid, España) and eosin solution was prepared by dissolving 0.5 g Eosin Yellowish (Panreac Quimica SA, Barcelona, Spain) in 100 ml water with 200µl glacial acetic acid (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain). Ethanol absolute and xylene were obtained from VWR (VWR, Leuven, Belgium).

For immunofluorescence analysis, frozen muscle sections were fixed in cold (-20°C) acetone (Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain) for 5 min, air-dried and blocked in PBS containing 3% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain) for 10 minutes at room temperature and then incubated with primary antibodies diluted 1:100 in PBS (Phosphate buffered saline, Biowest, Barcelona, Spain). The primary antibodies used were against rabbit anti-Collagen-I (Abcam, Cambridge, UK) and mouse anti-CS (Abcam, Cambridge, UK) for 16 h in a humid chamber at 4°C. Samples were washed three times in PBS and incubated with

the secondary antibodies Alexa Fluor® 568 anti-mouse or Alexa Fluor® 488 anti-rabbit (Invitrogen, Oregon, USA) diluted 1:1000 in PBS in a dark humid chamber for 1 h at room temperature. Finally, slides were washed three times with PBS and mounted using a coverslip and Fluoromount-G (Southern Biotech, Madrid, Spain) mounting medium. Fluorescence was evaluated by using a BX-61 microscope (Olympus) using a DP72 camera (Olympus) and CellSens® Digital Imaging software (version 1.9).

Determination of intramuscular CS deposition

Intramuscular levels of CS deposition were evaluated by determining the area of CS respecting to the total area in CS immunofluorescence microphotographs. The percentage of CS area was measured by using the Threshold Color plugin for Image J software version 1.46 as an average between 3 and 4 images obtained from every muscle sample. The same threshold set was used for all samples analyzed in CS determination.

Analysis of muscle fibers cross-sectional area and Collagen-I expression

In order to evaluate the degree of muscle regeneration and fibrosis in the injured area of gastrocnemius muscle samples, we measured the size of newly formed muscles fibers as well as the expression levels of the fibrosis marker collagen-I in microphotographs obtained by immunofluorescence analysis.

The cross-sectional area (CSA) of newly formed muscles fibers was measured in collagen-I immunofluorescence microphotographs. Three images were randomly selected within the injured area of gastrocnemius muscle cross-sections by using a BX-61 microscope (Olympus) equipped with a DP72 camera (Olympus) and CellSens® Digital Imaging software (version 1.9). For CSA determination, a total of 200-300 fibers per muscle in each group were counted and measured after Collagen-I immunostaining of muscle samples. Areas of muscle fibers were calculated using Image J software version 1.46 (NIH, Bethesda), based on a calibrated pixel-to-actual size (μm) ratio.

The degree of fibrosis was evaluated in Collagen-I immunofluorescence images by determining the area of Collagen-I respecting to the total area in microphotographs. The percentage of collagen-I area was measured by using the Threshold Color plugin for Image J software version 1.46 as an average between 3 and 4 images from every muscle sample. The same threshold set was used for all samples analyzed.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 20.0 (IBM; Armonk, New York, United States). The normality and homoscedasticity of the data were studied for each parameter to apply the correct statistical method (parametric or non-parametric). The Shapiro-Wilk test was used to verify the normal distribution of the data.

Paired Student's t test was used to determine statistical significance in comparisons of body mass (at the beginning vs the end of the experiment) and gastrocnemius muscle weight (injured (right) vs control (left) muscle) of every animal. The power analysis for the t-paired test was automatically performed to detect a minimum difference in means of 0.8 and with an alpha value of 0.05.

One-way ANOVA followed by pairwise multiple comparison procedures (post hoc Holm-Sidak test) was performed to assess the differences in body weight, muscle weight, and intramuscular CS or Collagen-I levels between the 4 groups of animals. Kruskal-Wallis was used to evaluate statistical significance in nonparametric comparisons between the different groups of animals for TetF (expressed as percentage of injured vs control muscle) and myofibers' CSA. In case of significant differences, Mann-Whitney *U* test was used to compare the different groups.

TetF was normalized to the individual gastrocnemius muscle mass and expressed in mN/g. Differences were considered significant with a *p* value less than 0.05. Data are presented as mean or median \pm SD or SEM.

RESULTS

Muscle and Body mass

As it is indicated in Table 1, no significant differences in body weight were observed between the four groups of animals at the beginning or at the end of the experiments. In addition, no significant differences were detected in gastrocnemius muscle mass either between the injured and the control muscle in each animal or between the animals in the four groups of treatment (Table 1).

Chondroitin sulfate and glucosamine treatments increase gastrocnemius muscle force

TetF of gastrocnemius muscle was measured both in the injured and healthy contralateral legs of each rat 3 weeks after treatments. The effect of the different treatments in muscle force recovery was determined by comparing the TetF percentage of injured versus contralateral uninjured muscle amongst the different groups of animals. As shown in figure 1, the animals belonging to untreated group showed more than 20% of decrease ($P < 0.001$) in TetF of the injured vs healthy contralateral leg ($78.1 \pm 4.9\%$) at 3 weeks after muscle injury when compared to healthy group of animals ($98.4 \pm 7.8\%$). Importantly, both oral and intraperitoneal CS+GLU treatments produced a significant increase in muscle force when compared to untreated animals. Rats in CGip group demonstrated the strongest effect ($94.9 \pm 7.2\%$ of TetF of the injured vs uninjured contralateral leg) in the improvement of gastrocnemius muscle force (approximately 21% of increase compared to untreated group of animals, $P < 0.001$), whereas the animals in CGo group showed a smaller (16%) increase ($90.7 \pm 5.4\%$, of TetF of the injured vs uninjured contralateral leg, $P < 0.01$) versus untreated animals (Figure 1).

Intramuscular Chondroitin sulfate deposition after treatments

The increase of the intramuscular levels of CS was evaluated by immunofluorescence analysis (Figure 2). The amount of CS was quantified by determining the area occupied by CS with respect to the total area in each of the microphotographs

obtained in the immunofluorescence analysis. As shown in figure 2, we detected a significant increase in the intramuscular CS levels in untreated ($P<0.05$), CGo and CGip ($P<0.001$) versus healthy animals. Importantly, both groups of treatment showed an increase in the intramuscular CS deposition (28.0 ± 2.1 % and 25.8 ± 2.5 % in the CGo ($P<0.01$) and CGip ($P<0.05$) groups, respectively) when compared to untreated injured animals (19.5 ± 3.9 % of intramuscular CS percentage). These data demonstrate that the administration of CS+GLU promotes the increase in the intramuscular CS levels independently of the route of administration.

The administration of chondroitin sulfate and glucosamine promotes the growth of newly regenerating muscle fibers

In order to evaluate the effect of the treatments on stimulating the growth of newly regenerating muscle fibers, we quantified the area of muscle fibers that appear in the area of muscle injury in collagen-I immunofluorescence images (Figure 3). An increase in myofibers' CSA was found in rats belonging to CGip and CGo groups in comparison to Untreated group of animals (Figure 3B), being the animals in CGip group which showed the largest (1.99-fold) increase in size ($564.2 \pm 25.5 \mu\text{m}^2$) compared to untreated ($283.1 \pm 13.9 \mu\text{m}^2$) animals ($P<0.001$). Oral treatment induced a smaller (1.25-fold) increase in myofibers' CSA ($353.2 \pm 17.2 \mu\text{m}^2$) with respect to untreated muscle ($P<0.001$).

Chondroitin sulfate in combination with glucosamine prevents fibrogenesis in regenerating muscle

The degree of fibrosis was evaluated by the deposition of collagen-I in immunofluorescence images after 3 weeks of treatment. As it is shown in figure 3C, a significant ($P<0.001$) increase in the intramuscular collagen-I levels were found in untreated, CGo and CGip versus healthy animals. However, both treatments showed a clear anti-fibrotic effect by reducing 21% (oral, $P<0.05$) and 28% (i.p., $P<0.01$) the intramuscular collagen-I deposition ($39.4 \pm 6.2\%$ and $35.7 \pm 5.3\%$ of collagen-I area vs total area, in groups CGo and CGip, respectively) when compared to untreated group of animals ($49.7 \pm 5.5\%$ of collagen-I area vs total area).

DISCUSSION

In the present work we evaluated the beneficial effects of the treatment with CS and GLU in skeletal muscle injuries using a recently developed animal model of surgically-induced muscle lesion which closely mimics the human sports-related muscle injuries [14]. Both CS and GLU molecules are well recognized as symptomatic slow-acting drugs for the treatment of OA and their application has an excellent safety profile, allowing long-term treatment [5,29,37,38,49]. Since *in vitro*, *in vivo* and clinical studies support existence of a synergistic effect of CS and GLU [7–10,12,21,36,41,44,45], in the present work the combination of both products was tested by oral administration or intraperitoneal injection in the rat experimental model in order to evaluate their potential therapeutic effects on muscle healing.

Interestingly, we found a significant improvement in muscle force together with an increase in the deposition of CS in regenerating muscle areas after 3 weeks of treatment by both oral and intraperitoneal CS+GLU administration. Intraperitoneal administration of the CS+GLU combination demonstrated the strongest increase in muscle strength (21% of increase versus untreated animals) whereas oral administration produced a smaller (16% of increase) effect in the recovery of maximal TetF. Our results corroborate previously reported data about the improvement of muscle strength at 30 days post-injury following decorin, a small leucine-rich proteoglycan linked to at least one chondroitin or dermatan sulfate side chain [25], administration in a laceration muscle injury model in rats [24]. Both treatments induced an important increase (more than 30% when compared to untreated animals) of CS deposition in muscle regenerating areas, demonstrating the effectiveness of both ways of administration to increase the intramuscular CS levels. These relevant results provide a better understanding of the kinetics and dynamics of CS in soft tissues, suggesting an interesting CS absorption in the muscle tissue after both oral and intraperitoneal treatments. Previous studies [40] demonstrated that oral CS reaches the joint and distributes into the cartilage and subchondral layers. However, data showing a CS penetration into the skeletal muscle were still limited. Therefore, our work reveals new promising evidence about the bioavailability of this glycosaminoglycan in soft tissues.

Remarkably, a concomitant increase in the growth of newly regenerating muscle fibers was also found after the treatment's administration. Intraperitoneal and oral CS+GLU administration promoted the increase in myofibers' CSA when compared to untreated animals (2- and 1.25-fold of increase in the caliber of regenerating myofibers in CGip and CGo groups, respectively). Our data demonstrates that the administration of the CS+GLU combination has an important beneficial effect on muscle healing, by promoting the improvement of muscle regeneration and the recovery of muscle function. Although there is no previous data reported about the effect of CS+GLU combination on muscle healing, earlier *in vitro* studies have reported the effect of other glycosaminoglycans (GAGs), such as Heparan sulfate, on muscle differentiation and the regulation of myoblast cell fate via FGF2 and Erk1/2 signaling [16].

Even though the exact molecular mechanism for our results is not known, one possible explanation to the increase in the muscle fiber size after the treatments with CS+GLU is based on that the composition of GAGs or PGs during the muscle regeneration process could modify the signals received by the cells participating on the muscle regeneration process. Since the most abundant PGs in skeletal muscle ECM contain chondroitin and dermatan sulfate GAG chains, they can be playing an important role in modulating the muscle precursor cells proliferation and differentiation processes all through the inflammatory, repairing or remodeling phases, due to the capacity of PGs to bind different growth factors and cytokines [17] all through muscle recovery process. Other potential explanation to the beneficial effects of CS+GLU treatment could be based on the increase of the levels of certain GAGs in the injured muscle area which can induce the reinnervation of regenerating muscle fibers and stimulate the muscle fiber maturation and the increase of muscle fiber's size. This hypothesis is supported by the fact that the treatment of sciatic nerve injury in rats by the intraperitoneal administration of a mixture of GAGs (including chondroitin or dermatan sulfates in the composition) increased insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the reinnervated muscle and prevented muscle fiber atrophy, indicating a potential role of GAGs on muscle reinnervation via IGF-I signaling pathway [18].

Since excessive fibrosis and scarring could be considered as a potential cause of re-injury in athletes after a skeletal muscle lesion, we also evaluated the degree of intramuscular fibrosis after the combined treatment with CS+GLU. Importantly, a clear anti-fibrotic effect was found in regenerating muscle areas after the 3-weeks of treatment, where the intramuscular collagen-I was reduced after both intraperitoneal and oral CS+GLU administration (28% and 21% of decrease in the intramuscular collagen-I deposition in CGip and CGo groups, respectively). These data demonstrate the added beneficial effect of GAGs administration during skeletal muscle healing process in order to prevent intramuscular fibrosis after an acute muscle injury episode. The anti-fibrotic effect of CS+GLU treatment could be explained by the fact that some PGs such as decorin, biglycan, and beta-glycans have the ability to bind TGF- β , a well-known pro-fibrotic cytokine [3,13,34,35,42,47], during skeletal muscle differentiation. The decrease of the bioavailability of TGF- β to its receptors could attenuate its activity during the formation of skeletal muscle [15]. Importantly, decorin has demonstrated its capacity to reduce intramuscular fibrosis and inflammation caused by TGF- β and myostatin in different animal models [28,50], which strongly supports the anti-fibrotic effect of CS-based PGs present on the ECM of skeletal muscle tissue.

Here we have addressed the effects of the combined treatment of CS+GLU by two different ways of administration in a well-characterized experimental skeletal muscle injury-model that closely mimics injuries seen in human athletes. Taken-together, we conclude that CS+GLU therapy have a beneficial effect on muscle healing in a surgically-induced muscle injury in rats. Our study shows that the treatment with the combination of CS and GLU enhanced the repair of the injured skeletal muscle and prevented the deposition of fibrotic compounds, such as collagen-I, and corroborates the key role of ECM components during muscle development and regeneration.

In summary, our data suggest that the combined treatment CS+GLU could represent a promising therapeutic target for the treatment of muscle injuries. In this way, knowledge of the molecular mechanisms by which CS and GLU modulate the process of muscle regeneration may provide the scientific evidence on the mechanism of action of sulfated GAG exogenous in skeletal muscle and generate new

therapeutic strategies for the treatment of skeletal muscle injuries in the human clinical practice. Our findings provide the basis for a better understanding of CS and GLU effects in soft tissues as well as for designing animal experiments and human studies which could lead to the development of novel therapeutic approaches for the prevention and management of sport-related injuries. Although further investigation is required, these therapeutic approaches could open new avenues for the treatment of human skeletal muscle injuries and could be considered as potential evidence-based strategies for the design of optimal therapeutic protocols in sports medicine.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from Bioibérica S.A.U. Company (Barcelona, Spain) and MTN2012005 from Fundació Leitat (Barcelona, Terrassa, Spain) and F. Futbol Club Barcelona (Barcelona, Spain) by its initiative MuscleTech Network (Barcelona, Spain). We thank Marta Rosal and Alejandro Rojo from the Animal Facility Unit of Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) for their valuable technical assistance. EM, AT and JV are employees of Bioibérica and provided input into the design and manuscript preparation. No non-financial conflicts exist for any of the authors.

REFERENCES

- ¹ Baumert P, Lake MJ, Stewart CE, Drust B, Erskine RM. Genetic variation and exercise-induced muscle damage: implications for athletic performance, injury and ageing. *Eur J Appl Physiol* 2016; 116: 1595–1625
- ² Beiner JM, Jokl P. Muscle contusion injuries: current treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9: 227–237
- ³ Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, Cornelio F, Morandi L, Mantegazza R. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* 1995; 96: 1137–1144
- ⁴ Best TM, Hunter KD. Muscle injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000; 11: 251–266
- ⁵ Bruyère O, Cooper C, Pelletier J-P, Maheu E, Rannou F, Branco J, Luisa Brandi M, Kanis JA, Altman RD, Hochberg MC, Martel-Pelletier J, Reginster J-Y. A consensus statement on the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) algorithm for the management of knee osteoarthritis—From evidence-based medicine to the real-life setting. *Semin Arthritis Rheum* 2016; 45: S3–S11
- ⁶ Calamia V, Fernández-Puente P, Mateos J, Lourido L, Rocha B, Montell E, Vergés J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte proteomes. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11: M111.013417
- ⁷ Calamia V, Mateos J, Fernández-Puente P, Lourido L, Rocha B, Fernández-Costa C, Montell E, Vergés J, Ruiz-Romero C, Blanco FJ. A pharmacoproteomic study confirms the synergistic effect of chondroitin sulfate and glucosamine. *Sci Rep* 2014; 4: 5069
- ⁸ Calamia V, Ruiz-Romero C, Rocha B, Fernández-Puente P, Mateos J, Montell E, Vergés J, Blanco FJ. Pharmacoproteomic study of the effects of

- chondroitin and glucosamine sulfate on human articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R138
- 9 *Chan P-S, Caron JP, Orth MW.* Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *J Rheumatol* 2006; 33: 1329–1340
- 10 *Chan PS, Caron JP, Rosa GJM, Orth MW.* Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E2 in articular cartilage explants. *Osteoarthr Cartil* 2005; 13: 387–394
- 11 *Chargé SBP, Rudnicki MA.* Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209–238
- 12 *Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, Bradley JD, Bingham CO, Weisman MH, Jackson CG, Lane NE, Cush JJ, Moreland LW, Schumacher HR, Oddis C V, Wolfe F, Molitor JA, Yocum DE, Schnitzer TJ, Furst DE, Sawitzke AD, Shi H, Brandt KD, Moskowitz RW, Williams HJ.* Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 795–808
- 13 *Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 2007; 13: 204–210
- 14 *Contreras-Muñoz P, Fernández-Martín A, Torrella R, Serres X, De la Varga M, Viscor G, Järvinen TAH, Martínez-Ibáñez V, Peiró JL, Rodas G, Marotta M.* A New Surgical Model of Skeletal Muscle Injuries in Rats Reproduces Human Sports Lesions. *Int J Sports Med* 2016; 37: 183–190
- 15 *Droguett R, Cabello-Verrugio C, Riquelme C, Brandan E.* Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. *Matrix Biol* 2006; 25: 332–341

- ¹⁶ *Ghadiali RS, Guimond SE, Turnbull JE, Pisconti A.* Dynamic changes in heparan sulfate during muscle differentiation and ageing regulate myoblast cell fate and FGF2 signalling. *Matrix Biol* 2017; 59: 54–68
- ¹⁷ *Gillies AR, Lieber RL.* Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 2011; 44: 318–331
- ¹⁸ *Gorio A, Vergani L, De Tollis A, Di Giulio AM, Torsello A, Cattaneo L, Muller EE.* Muscle reinnervation following neonatal nerve crush. Interactive effects of glycosaminoglycans and insulin-like growth factor-I. *Neuroscience* 1998; 82: 1029–1037
- ¹⁹ *Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z.* Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser* 1993; 3: 210–256
- ²⁰ *Hawke TJ, Garry DJ.* Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91: 534–551
- ²¹ *Hochberg MC, Martel-Pelletier J, Monfort J, Möller I, Castillo JR, Arden N, Berenbaum F, Blanco FJ, Conaghan PG, Doménech G, Henrotin Y, Pap T, Richette P, Sawitzke A, du Souich P, Pelletier J-P, MOVES Investigation Group.* Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 37–44
- ²² *Huard J, Li Y, Fu FH.* Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84–A: 822–832
- ²³ *Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M.* Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc* 1991; 23: 801–810
- ²⁴ *Hwang JH, Ra Y-J, Lee KM, Lee JY, Ghil SH.* Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Arch Phys Med Rehabil* 2006; 87: 20–26

- ²⁵ *Iozzo R V.* The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; 32: 141–174
- ²⁶ *Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Aärimala V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M.* Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007; 21: 317–331
- ²⁷ *Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M.* Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med* 2005; 33: 745–764
- ²⁸ *Järvinen TAH, Ruoslahti E.* Targeted Antiscarring Therapy for Tissue Injuries. *Adv wound care* 2013; 2: 50–54
- ²⁹ *Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JWJ, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, Lohmander S, Leeb B, Lequesne M, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Serni U, Swoboda B, Verbruggen G, Zimmerman-Gorska I, Dougados M, Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials ESCISIT.* EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1145–1155
- ³⁰ *Kääriäinen M, Järvinen T, Järvinen M, Rantanen J, Kalimo H.* Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10: 332–337
- ³¹ *Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M.* Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* 2009; 23: 779–796
- ³² *Lehto MU, Järvinen MJ.* Muscle injuries, their healing process and treatment. *Ann Chir Gynaecol* 1991; 80: 102–108
- ³³ *Leveille SG.* Musculoskeletal aging. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 114–118

- 34 *Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J.* Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol* 2004; 164: 1007–1019
- 35 *Li Y HJ.* Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol* 2002; 161: 895–907
- 36 *Lippiello L.* Collagen Synthesis in tenocytes, ligament cells and chondrocytes exposed to a combination of Glucosamine HCl and chondroitin sulfate. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007; 4: 219–224
- 37 *Martel-Pelletier J, Roubille C, Abram F, Hochberg MC, Dorais M, Delorme P, Raynauld J-P, Pelletier J-P.* First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 547–556
- 38 *Rillo O, Riera H, Acosta C, Liendo V, Bolaños J, Monterola L, Nieto E, Arape R, Franco LM, Vera M, Papasidero S, Espinosa R, Esquivel JA, Souto R, Rossi C, Molina JF, Salas J, Ballesteros F, Radrigan F, Guibert M, Reyes G, Chico A, Camacho W, Urioste L, Garcia A, Iraheta I, Gutierrez CE, Aragón R, Duarte M, Gonzalez M, Castañeda O, Angulo J, Coimbra I, Munoz-Louis R, Saenz R, Vallejo C, Briceño J, Acuña RP, De León A, Reginato AM, Möller I, Caballero C V, Quintero M.* PANLAR Consensus Recommendations for the Management in Osteoarthritis of Hand, Hip, and Knee. *J Clin Rheumatol* 2016; 22: 345–354
- 39 *Rodeo SA.* Biologic Approaches in Sports Medicine: Potential, Perils, and Paths Forward. *Am J Sports Med* 2016; 44: 1657–1659
- 40 *Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G.* Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthr Cartil* 1998; 6 Suppl A: 14–21
- 41 *du Souich P.* Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. *Pharmacol Ther* 2014; 142: 362–374

- 42 *Stauber WT, Smith CA, Miller GR, Stauber FD.* Recovery from 6 weeks of repeated strain injury to rat soleus muscles. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1819–1825
- 43 *Takeda H, Nakagawa T, Nakamura K, Engebretsen L.* Prevention and management of knee osteoarthritis and knee cartilage injury in sports. *Br J Sports Med* 2011; 45: 304–309
- 44 *Tat SK, Pelletier J-P, Vergés J, Lajeunesse D, Montell E, Fahmi H, Lavigne M, Martel-Pelletier J.* Chondroitin and glucosamine sulfate in combination decrease the pro-resorptive properties of human osteoarthritis subchondral bone osteoblasts: a basic science study. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R117
- 45 *Terencio MC, Ferrándiz ML, Carceller MC, Ruhí R, Dalmau P, Vergés J, Montell E, Torrent A, Alcaraz MJ.* Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 79: 120–128
- 46 *Wolf AD, Pflieger B.* Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003; 81: 646–656
- 47 *Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M.* Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol* 1994; 144: 221–226
- 48 *Zeng C, Wei J, Li H, Wang Y, Xie D, Yang T, Gao S, Li Y, Luo W, Lei G.* Effectiveness and safety of Glucosamine, chondroitin, the two in combination, or celecoxib in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Sci Rep* 2015; 5: 16827
- 49 *Zeng C, Wei J, Li H, Wang Y, Xie D, Yang T, Gao S, Li Y, Luo W, Lei G.* Effectiveness and safety of Glucosamine, chondroitin, the two in combination, or celecoxib in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Sci Rep* 2015; 5: 16827

- 50 *Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, Nozaki M, Branca MF, Huard J. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. J Biol Chem 2007; 282: 25852–25863*

Figure 1. Measurement of gastrocnemius muscle force after treatments.

Gastrocnemius muscle force was measured at the end of the treatments (3-weeks post-injury). Data represent maximum tetanus force (TetF) normalized to muscle mass for the injured vs contralateral control muscles. Values are presented as the mean \pm SD. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ vs untreated group.

Figure 2. Determination of intramuscular Chondroitin sulfate deposition after treatments.

Representative images (N=6/group) show Hematoxylin-Eosin stained sections (upper panel) and immunofluorescence analysis for CS (lower panel) at 3-weeks post-injury. The degree of intramuscular CS deposition was evaluated in CS immunofluorescence images by determining the area of CS respecting to the total area in microphotographs. Images show (x100) microphotographs for all panels. The percentage of collagen-I area was measured by using the Threshold Color plugin for Image J software version 1.46 (NIH) as an average between 3 and 4 images in every muscle sample. The same threshold set was used for all samples analyzed. Values are presented as the mean \pm SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs untreated group, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.001$ vs Healthy group.

Figure 3. Analysis of the cross-sectional area of myofibers and degree of fibrosis in rat gastrocnemius muscle. (A)

Representative images (N=6 for each treatment) show Hematoxylin-Eosin stained gastrocnemius muscle cross-sections (upper panel) and immunofluorescence analysis for collagen-I (lower panel) after treatments (3-weeks post-injury). Images show (x100) microphotographs for all panels. **(B)** Cross-sectional area (CSA) of newly formed muscles fibers was measured in collagen-I immunofluorescence microphotographs. Three images were randomly selected within the injured area of gastrocnemius muscle cross-sections by using a BX-61 microscope (Olympus) equipped with a DP72 camera (Olympus) and CellSens® Digital Imaging software (version 1.9). The CSA values of 200-300 fibers per muscle were calculated using Image J software version 1.46 (NIH, Bethesda, MD), based on a calibrated pixel-to-actual size (μm) ratio. Values are presented as the median \pm SEM. * $P < 0.001$ vs Untreated group, # $P < 0.001$ vs Healthy group, § $P < 0.001$ vs CGo group. **(C)** The degree of fibrosis was evaluated in Collagen-I immunofluorescence images by determining the area of Collagen-I respecting to the total area in microphotographs. The percentage of collagen-I area was measured by

using the Threshold Color plugin for Image J software version 1.46 (NIH) as an average between 3 and 4 images in every muscle sample. The same threshold set was used for all samples analyzed. Values are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs untreated group, # $P < 0.001$ vs Healthy group.

Table 1. Body weight and gastrocnemius muscle mass. Anesthetized animals (N=6/group) were weighed just before to induce gastrocnemius muscle injury and at the end of the treatments. Right (injured) and left (control) gastrocnemius muscle (GM) were excised and weighed from all the animals just before euthanasia at the end of the treatment period. Values are presented as mean \pm SD.

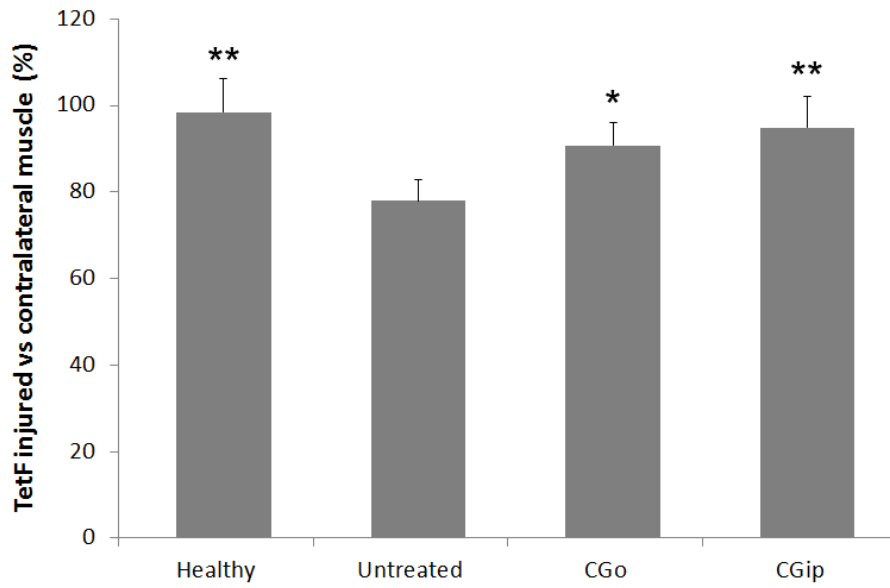
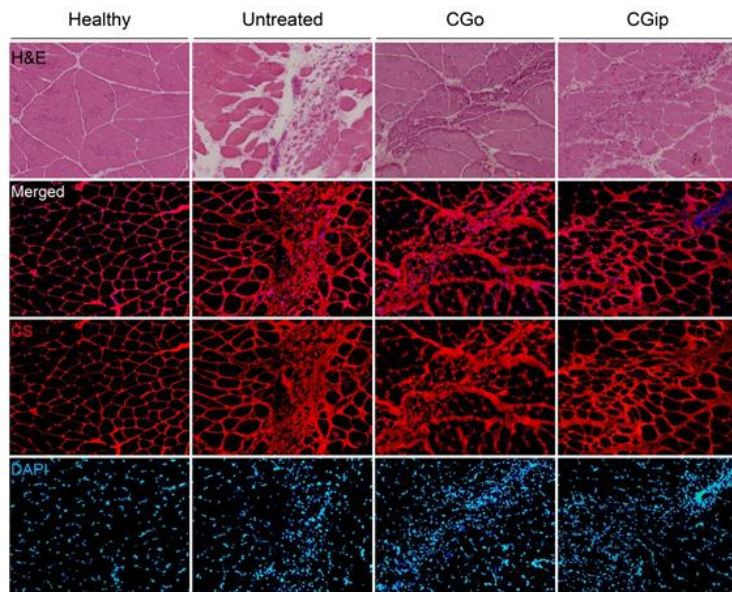
FIGURE LEGENDS**FIGURE 1**

FIGURE 2

A



B

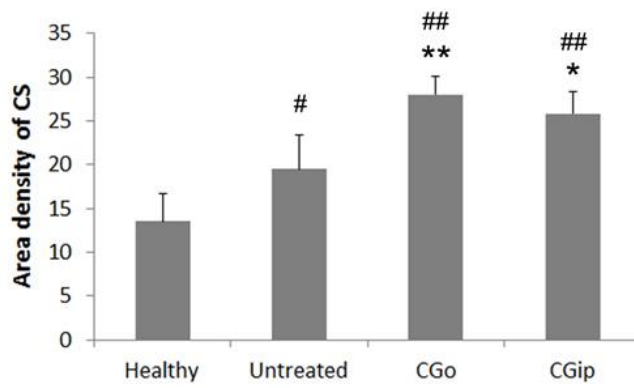
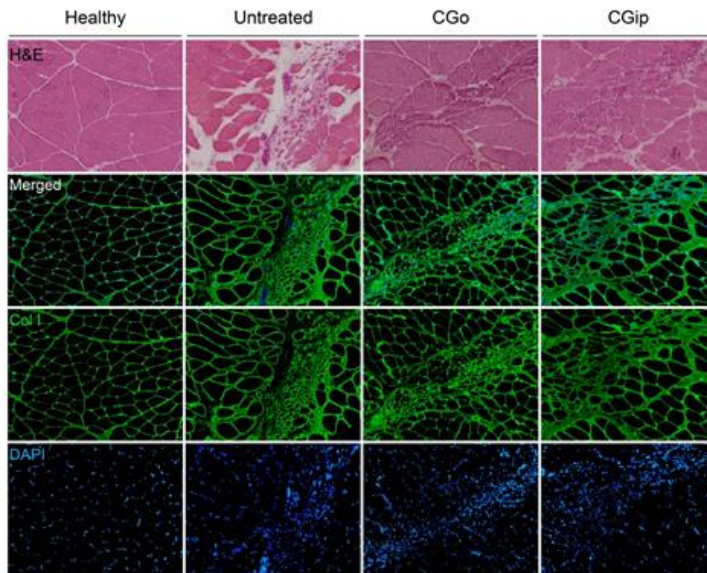
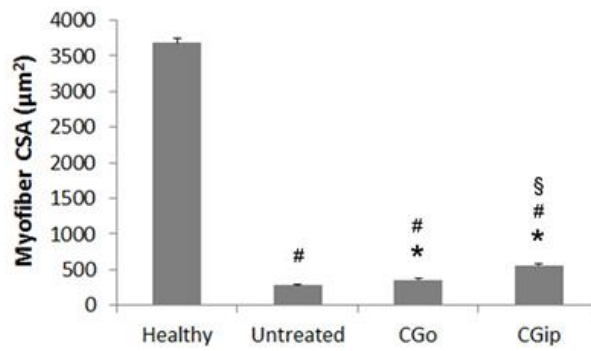


FIGURE 3

A



B



C

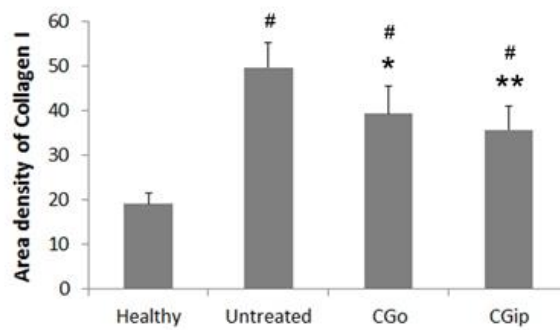


TABLE 1

	Body Mass (g) ± SD		Muscle Mass (g) ± SD	
	Initial Body Mass	Final Body Mass		Final GM Mass
Healthy	259.4 ± 7.8	335.3 ± 9.9	Control	2.0 ± 0.2
			Injured	2.1 ± 0.2
Untreated	261.8 ± 4.6	345.7 ± 8.3	Control	2.1 ± 0.1
			Injured	2.1 ± 0.2
CGo	253.2 ± 6.2	334.1 ± 9.7	Control	2.1 ± 0.1
			Injured	2.1 ± 0.1
CGip	251.9 ± 4.4	338.9 ± 13.8	Control	2.0 ± 0.1
			Injured	2.1 ± 0.1

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

1. Establecimiento de un nuevo modelo de lesión muscular que reproduzca la patología en clínica deportiva.

El nuevo modelo animal de lesión quirúrgica del músculo esquelético, ha demostrado con éxito ser un modelo económico, de fácil utilización y altamente reproducible, permitiendo estudiar las lesiones músculo-esqueléticas más frecuentes en la clínica humana. El modelo se generó mediante una lesión muscular transversal con un biopsiador automático en la zona miotendinosa del músculo gastrocnemio medial en modelo de rata.

A través de la histología (Hematoxilina y Eosina), se corroboró que los cambios histológicos ocasionados por el modelo de lesión, reproducen los procesos de necrosis y regeneración observados en otros modelos animales de lesión muscular inducida o espontánea, tales como los ratones distróficos *mdx*.

Con el fin de determinar la regeneración muscular y la fibrogénesis, se realizó un estudio por inmunofluorescencia para analizar los niveles de expresión de dMHC, un marcador del desarrollo muscular embrionario así como de regeneración muscular en tejido adulto tras lesión muscular; los niveles de fibrosis con el colágeno tipo I y la angiogénesis a través del marcador α -SMA, que se une a la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos y capilares. La expresión de los niveles de dMHC se observó a los 3 días post-lesión, alcanzando sus niveles máximos alrededor de los 9 días y es a partir de este momento, cuando comenzó a disminuir paulatinamente hasta ser indetectable a día 26, correspondiéndose a las últimas fases de la regeneración muscular. Por otro lado, el colágeno I, sufrió un fuerte incremento de expresión en las áreas lesionadas a partir de las 24h post-lesión. Coincidiendo con la presencia de las recién formadas miofibras, a partir de los 14 días, comienza a disminuir progresivamente, siendo aun detectable 35 días después de la lesión muscular. Así mismo, el marcaje de α -SMA se vio aumentado en las zonas de músculo en fase regenerativa, desde los días 9 al 21 después de la lesión, donde las nuevas fibras están creciendo para regenerar el tejido muscular y se genera un mayor requerimiento en el suministro de sangre y nutrientes.

El análisis por RM de la evolución longitudinal de la lesión en el músculo esquelético demostró que nuestro modelo de lesión muscular reproduce fielmente las lesiones

de grado I-II detectadas en jugadores de fútbol profesional, incluyendo el edema alrededor del tendón central y el típico patrón en forma de pluma a lo largo de las fibras musculares. Se registró una reducción significativa del 30% en la fuerza máxima tetánica 2 semanas después de la lesión, demostrando el efecto de nuestro nuevo modelo de lesión en la pérdida de fuerza muscular.

2. Desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en ejercicio físico y PRP, con el objetivo de mejorar la regeneración muscular y reducir la fibrosis en modelo de lesión muscular en rata.

En esta parte del trabajo de tesis doctoral, se evaluaron los efectos de la administración de una única inyección intramuscular de PRP guiada por ecografía a las 24 horas post-lesión, el tratamiento con ejercicio diario post-traumático y la combinación de ambos, en la regeneración del músculo esquelético en el modelo experimental en rata de lesión muscular.

Tanto el PRP (con una concentración plaquetaria 4.8 veces mayor que la sangre completa) como el ejercicio físico, mejoraron la fuerza muscular en aproximadamente 18%, 20% y 30% de las ratas en los grupos PRP, PRP-Exer, y Exer, respectivamente. Así mismo, el PRP y el ejercicio estimularon el crecimiento de las fibras musculares recién formadas (aumento del 1,5, 2 y 2,5 veces en el área transversal de la miofibra en los grupos PRP, PRP-Exer y Exer, respectivamente, en comparación con los animales no tratados o inyectados con salino). Tras la evaluación del grado de fibrosis a través de la expresión y deposición del colágeno I, se observó que los grupos de animales PRP, PRP-Exer y Exer mostraron niveles de colágeno I significativamente menores (disminución del 20%, 34% y 41%, respectivamente) demostrando el efecto de prevención de fibrosis de los tratamientos administrados. Los músculos tratados con ejercicio (grupos PRP-Exer y Exer) mostraron una reducción significativa en el número de miofibras en regeneración, MHCd positivas (disminución del 35% y 47%, respectivamente), lo que indica que el proceso de recuperación muscular y la sustitución de la isoforma dMHC por la miosina del músculo maduro en el proceso de diferenciación de las miofibras recién formadas se acelera en respuesta a la terapia basada en ejercicio físico.

3. Efectos de la terapia con GAG en modelo de lesión muscular en rata.

Con el fin de determinar el posible efecto terapéutico de la administración de CS y GLU (ambos compuestos utilizados para el tratamiento sintomático de la OA), se investigaron sus efectos mediante el tratamiento diario durante 3 semanas post-lesión, tanto por administración oral como por inyección intraperitoneal, en la mejora del proceso de regeneración muscular en el modelo de rata recientemente establecido de lesión muscular.

En primer lugar, se demostró que el tratamiento con CS + GLU produce un incremento de más del 30% en la deposición intramuscular de CS mediante ambas vías de administración. Se observó un incremento significativo en el crecimiento de las miofibras que se están regenerando (1,25 y 1,99 veces el aumento del área de la sección transversal de las fibras tras la administración oral e intraperitoneal respectivamente), que fue acompañado de una mejora significativa del 1,22 y 1,28 veces en la fuerza del músculo esquelético. Con respecto a la deposición de tejido cicatricial, ambos tratamientos mostraron un claro efecto anti-fibrótico en la reducción de la expresión colágeno I intramuscular (21% y 28%, oral e intraperitoneal). Estos resultados demuestran el efecto beneficioso del tratamiento de lesiones musculares con componentes de la familia de los GAGs, como la combinación de CS y GLU, y apuntan a su posible uso futuro como agentes terapéuticos en clínica humana, especialmente en medicina deportiva.

6. DISCUSIÓN

6.1. Lesiones deportivas en el músculo esquelético y problemática

Las lesiones del músculo esquelético son las patologías más comunes en el ámbito deportivo; una de las más frecuentes es la distensión muscular (Orchard 2001; Weishaupt et al. 2001), la cual conlleva a menudo, la incapacidad del atleta para entrenar o competir durante varias semanas (Almekinders 1999).

Las distensiones musculares se producen principalmente a través de dos mecanismos: un alargamiento forzado y repetido de la unidad músculo-tendinosa, que puede originar DOMS o un estiramiento agudo que conduce al desgarro muscular; como por ejemplo la lesión *pierna de tenista* en el músculo gastrocnemio, una de las regiones más susceptibles de sufrir este tipo de lesiones (Delgado et al. 2002; Millar 1979). Así mismo, en el fútbol profesional entre el 92 y el 97% de todas las lesiones musculares se localizan en las extremidades inferiores: músculos isquiotibiales (28-37%), cuádriceps (19-32%), aductores (19-23%) y músculos de la pantorrilla (12-13%) (Jan Ekstrand et al. 2011; Volpi et al. 2004). Estos músculos de *alto riesgo*, suelen estar compuestos por un alto porcentaje de fibras musculares de tipo II, lo que sugiere que el perfil metabólico de la fibra es importante para determinar sus características funcionales y el riesgo de sufrir una lesión (Toumi et al. 2006).

Las distensiones se generan a través de movimientos que ocurren de manera habitual en los deportes, como correr y saltar (Stanton & Purdham 1989; Garrett et al. 1984), originándose por algún tipo de *sprinting*, salto, parada repentina o cambio de dirección. Así mismo, las lesiones por un único estiramiento agudo, suelen ser las más frecuentes (Askling et al. 2007; Askling et al. 2012). Éstas, además, pueden aumentar el riesgo de *re-injury*, por ejemplo, si un individuo sufre una lesión en el músculo isquiotibial, existe entre un 12-31% de probabilidades de sufrir la lesión otra vez (Barr 2007). Este hecho puede deberse a la fatiga muscular, a un calentamiento insuficiente, desequilibrios musculares y/o cambios arquitectónicos en las miofibrillas, especialmente después de distensiones moderadas o severas (Ali & Leland 2012; Croisier 2004).

El cuadro clínico de una distensión muscular depende de la extensión y naturaleza de la destrucción muscular y del hematoma que se desarrolla en el sitio de la lesión. Su fisiopatología se caracteriza por la descomposición del sarcolema y las unidades del sarcómero, así como por el daño de la membrana de las fibras musculares, seguido por la entrada de calcio extracelular a la célula muscular, lo que desencadena la destrucción de estas estructuras y la evolución del proceso inflamatorio (Järvinen et al. 2000; Stauber 2004; Stauber & Willems 2002).

Las lesiones por distensión muscular se localizan normalmente cerca de una MTJ proximal, distal o situada dentro de un tendón intramuscular (Askling et al. 2007; Nikolaos Malliaropoulos et al. 2010; Garrett et al. 1989). En un modelo animal de lesión por estiramiento muscular o *stretching*, Garrett y colaboradores (Garrett et al. 1987) observaron que todas las lesiones se produjeron en la MTJ, en los extremos o en el interior del músculo. De Smet y colaboradores (De Smet & Best 2000), corroboraron estos hallazgos con un estudio clínico, en el cual observaron que todas las lesiones agudas estudiadas en el músculo isquiotibial se localizaron en la MTJ, ya fueran intramusculares o en la unión proximal o distal entre el tendón y el centro del músculo. Además, la fuerza que crea la lesión se transmite a través de la ECM (Gillies & Lieber 2011), por tanto, cuanto más cerca esté ubicada de la MTJ, mayor será la cantidad de ECM que resultará lesionada y más grave será el deterioro clínico (Balius et al. 2009).

Por otro lado, los desgarros de fibras en la MTJ, que afectan al tendón intramuscular en el isquiotibial o el cuádriceps se asocian con una mayor duración en el *return-to-play* (Balius et al. 2009; Comin et al. 2013). Un equipo europeo de fútbol de élite puede anticipar hasta 15 lesiones musculares por temporada, lo que da como resultado hasta 223 días de ausencia de entrenamiento (27% de la pérdida de tiempo total) y la falta de 37 partidos por parte de los jugadores (Jan Ekstrand et al. 2011). Sin embargo, determinar cuándo un atleta está listo para volver a competir tras una lesión muscular (debido a la variabilidad de recuperación existente) es un reto (Ekstrand et al. 2012; Orchard et al. 2005). El *return-to-play* prematuro podría ser uno de los factores que contribuyen a las altas tasas de *re-injury* observadas (12-43%), prolongando así la vuelta del deportista a la competición (Jan Ekstrand et al.

2011; Ekstrand et al. 2012; Orchard et al. 2005; Carling et al. 2011; Koulouris et al. 2007; Malliaropoulos et al. 2011).

Significativamente, los equipos de fútbol profesional con menores tasas de lesiones en la temporada, obtienen mejores resultados en sus competiciones nacionales e internacionales (Eirale et al. 2013; Hägglund et al. 2013). Por lo que, las lesiones musculares son una preocupación importante en la medicina deportiva.

6.2. Desarrollo de un nuevo modelo pre-clínico de lesión muscular

Las lesiones musculares humanas resultan difíciles de estudiar, debido en parte a su incidencia, un evento aleatorio difícil de predecir, a la gran variabilidad existente en clínica y a la dificultad de obtener muestras de tejidos para su estudio anatomopatológico. Por ello, el desarrollo de modelos animales de lesión muscular, es una herramienta indispensable para el estudio de estas patologías, permitiéndonos reproducir las lesiones observadas en humanos y estudiar las características biomecánicas y los cambios histológicos involucrados en la lesión muscular y su rehabilitación (Puntel et al. 2011; Menetrey et al. 2000; Minamoto et al. 2001; Pratt et al. 2012; Silveira et al. 2010; Ghaly & Marsh 2010).

Los modelos animales que tratan de imitar las lesiones musculares por distensión, pueden utilizar la estimulación eléctrica del músculo para simular contracciones excéntricas (Ingalls, Warren & Armstrong 1998; Song et al. 2012; Song et al. 2004) o bien usar la tracción del tendón del músculo para provocar la lesión (He et al. 2008; Ramos et al. 2012). Para este primer tipo de lesión, existen dos subgrupos: el primero consiste en activar un nervio específico mientras la articulación está en movimiento (Butterfield & Herzog 2006) y el segundo en utilizar electrodos, directamente sobre la piel o insertados subcutáneamente, con el fin de estimular el músculo eléctricamente (Song et al. 2004). Ambos presentan características comunes con las lesiones musculares por distensión, aunque la estimulación eléctrica del nervio tiende a ser más efectiva para la activación de músculos específicos. La eficacia de la estimulación muscular eléctrica más superficial está limitada además por la propia piel y depende del tipo de corriente eléctrica, así como de los parámetros utilizados (como la frecuencia y el voltaje) (Ward 2009). Sin

embargo, aun teniendo en cuenta todos estos factores, no existe garantía de que realmente se produzca una activación máxima del músculo, especialmente en las fibras y unidades motoras más alejadas de la piel. El modelo de distensión que utiliza la tracción del tendón del músculo, se genera comúnmente a través de una cirugía. Éste, es unido a un cable y a través de un extensómetro, que mide la longitud de la tensión producida; se estira hasta provocar la distensión del músculo (Y.-S. Chan et al. 2005; Obremsky et al. 1994; Carvalho et al. 2010; Feng et al. 2004; He et al. 2008).

Estos modelos de lesión por distensión presentan ciertas ventajas con respecto a los estudios en humanos, ya que se pueden estudiar parámetros funcionales y morfológicos de músculos aislados, así como, controlar con precisión la velocidad, la aceleración y el rango de movimiento utilizados en la distensión experimental.

Sin embargo, en el caso de las lesiones inducidas a través de estimulación eléctrica, todas las unidades motoras son reclutadas, llevando al músculo a un 100% de activación de sus miofibras, con el fin de obtener una lesión consistente. Situación muy diferente de la que normalmente ocurre en los seres humanos, donde el reclutamiento de unidades motoras es gradual y las distensiones musculares pueden estar sometidas a una carga baja, a una alta repetición o a cargas elevadas en movimiento (Eirale et al. 2013; Toumi et al. 2006). Así mismo, existe variabilidad con respecto al lugar exacto de generación de la lesión en este tipo de modelo animal, pudiendo afectar a la gravedad de la misma.

Por tanto, la principal limitación de estos estudios es la variedad de técnicas y modelos utilizados, donde la mayoría son difícilmente reproducibles y apenas simulan los tipos de lesiones observadas en clínica humana de una manera controlada; siendo además poco fiable la extrapolación de los datos obtenidos a los seres humanos. Esto dificulta la reproducción de los procesos patológicos más frecuentes, así como la generación y desarrollo de nuevos tratamientos (Toumi et al. 2006).

Por todo ello, decidimos desarrollar un nuevo modelo de lesión muscular inducida en ratas, fácil de reproducir, de generación sencilla y que pudieran imitar las lesiones más frecuentes del músculo esquelético observadas en la clínica deportiva

humana. Este modelo se generó quirúrgicamente en la región MTJ del músculo gastrocnemio medial, a través de un biopsiador o *trucut*, mediante el cual pudimos controlar tanto la orientación (transversal) como la altura y la profundidad de la lesión (3 mm desde el comienzo de la MTJ y 2 mm de profundidad).

El nuevo modelo de lesión muscular, podrá ser de gran ayuda en la investigación de las lesiones músculo-esqueléticas; así como servir de herramienta para testar *in vivo* nuevos enfoques terapéuticos, con el fin de prevenir o mejorar este tipo de lesiones.

6.2.1. Caracterización del nuevo modelo experimental de lesión muscular en rata

6.2.1.1. Evaluación histopatológica

Mediante el estudio de la evolución de la lesión muscular generada por nuestro recientemente establecido modelo de lesión en ratas, pudimos determinar el tamaño de la lesión en el músculo gastrocnemio medial y los cambios histológicos y moleculares producidos en el proceso de necrosis-regeneración del músculo, por histología e inmunofluorescencia.

Este nuevo modelo de lesión muscular quirúrgica en rata, no sólo desencadenó la ruptura de fibras musculares, sino también del tejido conjuntivo, junto con los nervios y vasos sanguíneos presentes en la zona de escisión. Las fibras musculares dañadas sufrieron una retracción, dejando un espacio de unos 0,84 mm de ancho. El tamaño de la lesión muscular generada se cuantificó mediante tinciones con Hematoxilina y Eosina (H-E) en los días 1, 3, 5, 7, 14, 21, 26, 35 y 46 post lesión (**I**: Fig. 2), ocupando un área de un 30% aproximadamente a las 24h de la lesión y disminuyendo progresivamente hasta alcanzar un 2% del área total del gastrocnemio medial de rata a los 46 días.

Así mismo, el estudio de la evolución de la lesión muscular (**I**: Fig. 3), corroboró que los cambios histológicos en nuestro modelo de lesión, reproducen ampliamente los procesos de necrosis, inflamación y regeneración observados en otros modelos de lesión muscular inducida (Hurme et al. 1991; Yan et al. 2003; Harris & Johnson 1978; Mitchell et al. 1992), así como los observados en animales de lesión

espontánea del músculo esquelético, como los ratones distróficos *mdx* (Marotta et al. 2007).

Durante la regeneración muscular, los miotubos multinucleados recién formados expresan marcadores de desarrollo, como dMHC, un conocido marcador de regeneración muscular (Marotta et al. 2007; Sartore et al. 1982; Y.-S. Chan et al. 2005). Analizamos la expresión de dMHC en el área lesionada de nuestro modelo de lesión, la cual comenzó a ser detectable 3 días después de la lesión, coincidiendo con la regeneración de pequeños miotubos y manteniéndose hasta los 14 días. Estos resultados se corresponden con el estudio de expresión de dMHC llevado a cabo en un modelo de lesión inducida por inyección de bupivacaína en el músculo extensor largo de los dedos de rata (Ciciliot & Schiaffino 2010). A partir de los 14 días, la expresión de dMHC fue desapareciendo progresivamente, hasta volverse prácticamente indetectable a los 21 días, coincidiendo con la fase de maduración de las fibras regeneradas.

Por otro lado, analizamos la posible formación de fibrosis intramuscular en nuestro modelo, mediante la presencia del marcador fibrótico, el colágeno tipo I. La expresión de colágeno I experimentó un gran aumento en el área lesionada entre los días 3-9 tras el daño muscular, pero a partir del día 14, la deposición de colágeno tipo I se redujo progresivamente. Sin embargo, un mes después de la creación de la lesión muscular, observamos una acumulación de colágeno tipo I en la zona de la lesión, similar a una cicatriz (**I**: Fig. 3). La regeneración de las lesiones del músculo esquelético en el ámbito deportivo, desencadenan de manera habitual la formación de tejido cicatricial (Vaittinen et al. 2002). Estas cicatrices intramusculares, pueden desencadenar efectos importantes, como debilidad muscular y aumentar la probabilidad de *re-injury* (Croisier et al. 2002).

Este modelo, por lo tanto, podría ser muy útil como herramienta de estudio de nuevos tratamientos que disminuyan la acumulación de tejido fibrótico o prevengan la formación de cicatrices. Mediante por ejemplo, agentes anti-fibróticos como Suramina, un antagonista de TGF- β 1, que ha demostrado su capacidad para reducir la formación de cicatrices fibrosas en el músculo y mejorar la fuerza muscular en la lesión del músculo esquelético lesionado (Y.-S. Chan et al. 2005), o CAR-decorin, un

potente inhibidor de la formación de cicatrices por la neutralización de las isoformas TGF- β 1 y β 2, responsables de la cicatrización (Järvinen & Ruoslahti 2010).

6.2.1.2. Estudio funcional mediante la evaluación de fuerza muscular

Los cambios histopatológicos hallados en las lesiones musculares, no siempre se correlacionan con la pérdida de fuerza (Stauber & Willems 2002; Warren et al. 1999). Especialmente, la relación entre la expresión de proteínas miogénicas y la recuperación de la funcionalidad muscular (Song et al. 2012). La razón de esta falta de correspondencia reside en que la pérdida de fuerza es causada por la ruptura del sarcómero (Gibala et al. 1995; Proske & Morgan 2001), las lesiones por sobre-estiramiento de las fibras musculares (Fridén & Lieber 1998; Ogilvie et al. 1988) y/o el fallo del sistema de acoplamiento excitación-contracción (Proske & Morgan 2001; Ingalls, Warren, Williams, et al. 1998); mientras que los cambios histopatológicos se observan siempre que existe una alteración de la homeostasis del calcio, (Duan et al. 1990) desencadenando muerte celular y necrosis (Wrogemann & Pena 1976). Dado que la función contráctil completa puede persistir a pesar de la presencia de marcadores de lesión, la pérdida de fuerza puede ser la medida más válida de la lesión (Brooks et al. 1995), y probablemente la más relevante.

Por tanto, analizamos la fuerza del músculo esquelético de rata tras la generación de nuestro modelo de lesión, con el fin de determinar la reducción de fuerza muscular. La medición de la máxima fuerza tetánica (*Tetanus force*, TetF) demostró una disminución de aproximadamente el 30% de la fuerza total del músculo gastrocnemio medial 2 semanas después de la lesión (I: Fig. 6). Nuestros resultados corroboran datos anteriormente publicados en un modelo de rata de lesión muscular inducida por una inyección de bupivacaína intramuscular (Mauch et al. 2013), donde se describió una disminución del 37% en la fuerza tetánica en el músculo gastrocnemio de rata 2 semanas después de la lesión.

6.2.1.3. Caracterización de la lesión muscular mediante técnicas de imagen: RM

La gravedad de una lesión puede determinarse tanto por medios directos como indirectos (es decir, clínicamente, a través de estudios de imágenes y mediante análisis de sangre) (Guerrero et al. 2008). Dado que el análisis histológico del tejido muscular lesionado no es factible como prueba de diagnóstico de rutina, la descripción de la gravedad de la lesión se basa típicamente en los síntomas, información sobre el mecanismo de lesión y estudios de imagen. El pilar principal para la clasificación y diagnóstico de las lesiones musculares ha sido realizar la historia clínica completa y un examen físico, asistido por US y estudios de imagen por RM. Ésta última se utiliza para establecer la relación entre la evolución y el tipo de lesión, la localización de ésta y el compromiso con el tendón (Connell et al. 2004; Askling et al. 2008; Askling et al. 2006; Koulouris et al. 2007).

Estudios clínicos con RM y US revelaron que la lesión por distensión en el gastrocnemio, con frecuencia está involucrada en la MTJ (Bianchi et al. 1998; Weishaupt et al. 2001). Las lesiones intramusculares localizadas en la MTJ se definen por un patrón en forma de *pluma*, en el cual el edema y la hemorragia se infiltran alrededor de las fibras musculares que se mantienen intactas en el sitio de la lesión (Noonan & Garrett 1999). Este patrón se ha observado en estudios con RM y parece ser característico en las distensiones musculares (De Smet et al. 1990). Debido a que la gravedad de este tipo de lesión está directamente relacionada con el tiempo de cicatrización, la imagen por RM puede ser útil para determinar los períodos de recuperación y rehabilitación, especialmente en atletas de élite (Cross et al. 2004). Sin embargo, aunque los estudios de imagen tienen un buen valor de diagnóstico, su utilidad en la predicción del *return-to-play* utilizando el edema como marcador de lesión, es todavía limitado (Wangenstein et al. 2015).

Por tanto, debido a que la mayoría de las lesiones musculares humanas relacionadas con el deporte se evalúan mediante técnicas de imagen no invasivas como la RM, realizamos un estudio longitudinal de la lesión generada por nuestro nuevo modelo con el fin de evaluar su progresión y comparar nuestros hallazgos con las lesiones músculo-esqueléticas más comunes en los deportistas de élite.

Se obtuvieron imágenes por adquisición múltiple de datos utilizando secuencias *espín-echo rápido*, calibradas en T2 de baja resolución, en los planos axial, sagital y coronal. En general, todas las lesiones de los tejidos blandos se representan mejor en imágenes calibradas en T2, ya que optimizan el contraste entre el edema, hemorragia y el músculo normal adyacente (Toumi et al. 2006). El estudio de imagen por RM *in vivo* de la evolución longitudinal de la lesión muscular se realizó a días 1, 7, 10, 12, 15, 18, 21 y 26 tras efectuar la lesión en el músculo gastrocnemio medial en ratas (**I**: Fig. 4). Los resultados del estudio por RM demostraron la presencia y a las 24 horas post-lesión un edema que rodea el tendón central con el típico patrón en forma de *pluma*. A partir de este momento, el edema fue disminuyendo progresivamente hasta ser prácticamente indetectable transcurridos 26 días.

Estudios similares se han llevado a cabo (Y. S. Lee et al. 2011; Pratt et al. 2012) y, por ejemplo, Lee YS y colaboradores realizaron un estudio temporal por RM e histología a lo largo de la evolución de una lesión muscular inducida quirúrgicamente en rata a 1, 4, 7 y 10 días y 2, 3, 4, 6 y 8 semanas post-lesión. Observaron además, que la aparición del hematoma depende de la etapa de evolución de la lesión y que ésta, está fuertemente influenciada por la degradación de la hemoglobina (Bush 2000).

Cabe destacar que la comparación del análisis de RM de las lesiones originadas por nuestro modelo quirúrgico en ratas mostró una alta homología con las lesiones de tipo I-II observadas en jugadores profesionales de fútbol (**I**: Fig. 5). Tanto el edema como la forma de *pluma*, resultaron ser muy similares entre nuestro modelo de rata y los deportistas de élite 24 h después de la lesión, el cual se fue reabsorbiendo lenta y progresivamente a lo largo de las semanas siguientes.

6.3. Terapias biológicas en la medicina regenerativa aplicadas al deporte

El desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para las lesiones músculo-esqueléticas genera gran interés en la medicina del deporte, por lo que existe una búsqueda continua de nuevos tratamientos que mejoren la regeneración muscular y eviten la formación de fibrosis y cicatriz intramuscular. Sin embargo, el avance en la generación de estas terapias evoluciona muy lentamente.

Tradicionalmente, se han llevado a cabo tres escuelas de pensamiento: de rehabilitación, quirúrgicas y biológicas. Aunque las dos primeras se complementan, el desarrollo de enfoques biológicos para mejorar la regeneración del músculo esquelético, pocas veces se ha integrado en el mundo de la rehabilitación. Esta podría ser la razón por la que el desarrollo de las terapias biológicas para las lesiones musculares aún no ha logrado una integración significativa en la práctica médica. Por otro lado, una de las principales estrategias que se están implementando actualmente, es promover la colaboración entre investigadores básicos y clínicos, con el fin de apoyar el avance, la aplicación y la traslación clínica de la investigación pre-clínica.

6.3.1. Efectos de la terapia con PRP y Rehabilitación activa temprana

La cantidad de plaquetas de la que se compone el PRP, pueden llegar a estar hasta 8 veces más concentrada que en la sangre completa (Creaney & Hamilton 2008), éstas contienen gránulos- α que pueden liberar una multitud de factores de crecimiento como PDGF, IGF-1, TGF- β , FGF, VEGF, el factor de crecimiento epidérmico y HGF (Creaney & Hamilton 2008; El-Sharkawy et al. 2007). Una de las grandes ventajas del PRP es su obtención, simple y mínimamente invasiva, pudiendo concentrarse fácilmente una mezcla natural de factores de crecimiento autólogos, críticos para la reparación de lesiones.

Hasta hace poco tiempo, el PRP ha sido considerado una simple mezcla de factores de crecimiento; sin embargo, gracias a los análisis proteómicos, se han podido catalogar un gran número de proteínas diversas (Andia & Maffulli 2013). Esto podría implicar el desarrollo de nuevas formulaciones basadas en la selección de algunos de sus componentes. Sin embargo, la asignación de un papel funcional a cada proteína de esta mezcla compleja, es un reto que no sólo se basa en la investigación del PRP, sino en los avances de la proteómica funcional. La investigación del PRP presenta un gran desafío, ya que implica el conocimiento profundo de la patología a ser tratada, y de los mecanismos funcionales y regenerativos de sus componentes, además de las interacciones con los diversos sistemas.

El concepto de su aplicación, es reemplazar el coágulo sanguíneo intramuscular generado en la lesión, por componentes sanguíneos seleccionados, es decir, plaquetas, plasma y opcionalmente leucocitos; y utilizarlos para potenciar los mecanismos de regeneración. Tras la inyección de PRP en la lesión muscular, el desarrollo local del coágulo o *scaffold* de fibrina rico en plaquetas, proporciona hemostasia y permite la liberación lenta de factores de crecimiento y citoquinas. Este agregado molecular influye en las diferentes etapas de la regeneración muscular, como la necrosis, la respuesta inmune (extravasación de neutrófilos y posterior infiltración de monocitos de macrófagos), la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la regeneración nerviosa (reinervación muscular) y la remodelación tisular.

Por otro lado, existen evidencias experimentales que confirman que la movilización (ejercicio físico) temprana en forma de rehabilitación activa después de un trauma muscular conduce a una mejora en la regeneración de las fibras musculares si lo comparamos con la inmovilización del músculo dañado (Järvinen 1976b; Lehto, Duance, et al. 1985). Khattak y colaboradores (Khattak et al. 2010), observaron que la movilización temprana afecta favorablemente a la cicatrización del músculo lesionado, dando lugar a una formación temprana de miotubos.

El entrenamiento físico origina cambios moleculares, bioquímicos y estructurales tanto en las mitocondrias como en la fibra muscular, además de promover la angiogénesis y el flujo sanguíneo, mejorando la actividad metabólica (Scribbans et al. 2014; Irrcher et al. 2003). Así mismo, aumenta la secreción de factores de crecimiento promoviendo la activación miogénica y disminuyendo la formación de fibrosis tras una lesión músculo-esquelética (Brutsaert et al. 2002; Costa et al. 2007; Faria et al. 2008; Gregory et al. 1995). Se ha demostrado en roedores, un aumento significativo de las SC y una alteración en el tipo de fibra en los músculos sometidos a ejercicios de resistencia, inducidos por la actividad en rueda libre o el entrenamiento en cinta de correr o *treadmill* (Cisterna et al. 2016; Kurosaka et al. 2009; Parise et al. 2008).

En el presente trabajo diseñamos un estudio experimental clásico 2x2 con el fin de evaluar el efecto beneficioso sobre la regeneración del músculo esquelético lesionado utilizando nuestro recientemente establecido modelo de lesión muscular. Los

tratamientos aplicados se basaron en: a) la administración de una única inyección intramuscular de PRP guiada por US 24 h después de la lesión, b) un patrón progresivo de ejercicio diario en *treadmill* como rehabilitación activa temprana o, c) la combinación de ambas estrategias terapéuticas.

El US se considera el método más eficaz en guía de inyecciones de tejidos blandos (Sampson et al. 2008); de hecho en la fase aguda (2-48h) de las lesiones musculares por distensión, es la herramienta de diagnóstico más utilizada. La sensibilidad es similar a la obtenida por RM, debido principalmente a la capacidad de detección de la acumulación de líquido post-traumático (Koulouris & Connell 2005). Por otro lado, para llevar a cabo la rehabilitación activa temprana, utilizamos como herramienta terapéutica, el entrenamiento con *treadmill*, uno de los más usados en estudios experimentales. Entre sus múltiples ventajas, su uso por ejemplo a baja intensidad, evita en parte el riesgo de *re-injury* (Baltgalvis et al. 2012).

6.3.1.1. Estudio funcional de recuperación de fuerza muscular

La medida de la funcionalidad del músculo demostró que los tratamientos basados en el ejercicio y el PRP no sólo estimularon el crecimiento de las fibras musculares y poseen un efecto anti-fibrótico, sino que también mejoran las propiedades contráctiles del músculo lesionado y la recuperación de la fuerza muscular. Los resultados obtenidos en la evaluación de la TetF máxima en los diferentes grupos de animales demostraron una recuperación de fuerza muscular significativa en todos los animales tratados. La terapia basada en el ejercicio demostró un mayor efecto beneficioso (casi el 30% de mejora en la TetF máxima y 2,5 veces el aumento en tamaño de miofibra); sin embargo, se ve afectado negativamente cuando lo combinamos con la inyección de PRP (**II**: Fig. 2). Nuestros hallazgos corroboran datos previamente descritos en dos tipos diferentes de rehabilitación con ejercicios de resistencia aeróbica post-lesión; destacando su superioridad con respecto a la inmovilización, así como la rehabilitación activa temprana frente a una más tardía (Gregory et al. 1995). Por otro lado, PRP mostró una mejora en la función contráctil del músculo lesionado con respecto al grupo control y salino. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Hammond JW y colaboradores (Hammond et al. 2009), en el que en un modelo de rata por distensión, observaron 14 días post

lesión un aumento de fuerza muscular en los músculos tratados con PRP en comparación los grupos tratados con PPP y el grupo control.

6.3.1.2. Evaluación histológica del efecto terapéutico de los tratamientos

Una de las principales preocupaciones en la regeneración muscular está a menudo relacionada con la fase de remodelación, que es menudo ineficiente y se ve obstaculizada por la formación de tejido cicatricial, generando una recuperación incompleta y pudiendo aumentar las probabilidades de *re-injury*. Estas lesiones ocasionan un gran impacto en los atletas, especialmente en los deportistas de élite, por lo que disminuir el tiempo tanto en la recuperación de la eficiencia muscular como en el *return-to-play*, es de vital importancia (J Ekstrand et al. 2011). Por tanto el desarrollo de terapias dirigidas que prevengan la excesiva deposición de colágeno I, podría representar enfoques terapéuticos prometedores para el tratamiento de las lesiones musculoesqueléticas (Ciciliot & Schiaffino 2010; Huard et al. 2002a).

Nuestros datos revelaron que los tratamientos basados en el ejercicio y el PRP mostraron un efecto anti-fibrótico estadísticamente significativo, con una disminución de la deposición de colágeno I en las áreas musculares lesionadas (**II**: Fig. 3C). Sin embargo, el mayor efecto anti-fibrótico fue observado en el grupo tratado únicamente con ejercicio. Nuestros resultados se corroboran con datos previamente publicados en un modelo de lesión por laceración, que demostró que el ejercicio post-lesión mediante estiramiento mejora la regeneración muscular y previene la fibrosis (Hwang et al. 2006).

Aunque el efecto del PRP en la prevención de la fibrosis fue menor que la terapia basada en el ejercicio, vale la pena señalar el efecto anti-fibrótico de la inyección intramuscular de PRP. Así mismo, un estudio realizado por Cunha y colaboradores (Cunha 2014), observó una disminución de colágeno I en la zona lesionada de animales tratados con PRP en asociación con entrenamiento físico. Aunque se ha descrito que el PRP podría participar en la inducción de miofibroblastos, contribuyendo a la formación de la cicatriz intramuscular (Kushida et al. 2013), debido a que uno de sus componentes, TGF- β 1, es un factor clave en el desarrollo de la fibrosis (Border & Ruoslahti 1992), cabe destacar que varios estudios *in vitro* han

demostrado que el PRP reduce la expresión de las citoquinas fibróticas, aumenta la proliferación de las células musculares y contribuye a un cambio miogénico significativo durante la diferenciación, especialmente si se combina con inhibidores de TGF- β , como la decorina (Järvinen & Prince 2015; Järvinen & Ruoslahti 2013; Kelc et al. 2015; Kvist et al. 1995; Li et al. 2016).

Mediante la evaluación de los niveles de expresión del marcador de regeneración muscular dMHC, observamos una destacable reducción en los animales tratados con ejercicios, indicando una aceleración en el reemplazo de la isoforma dMHC por isoformas de MHC maduras (**II**: Fig. 4). Estos datos demuestran que la fase crecimiento y maduración de las fibras musculares que se están regenerando en la zona de la lesión, se aceleraron por la terapia basada en el ejercicio. Este efecto fue también observado 10 días post-lesión en un modelo de criolesión de rata tratado con leucina (Pereira, Silva, et al. 2014). Curiosamente, se detectó un efecto adverso cuando este tratamiento se combinó con la administración de PRP.

Los resultados obtenidos al determinar el área de la sección transversal (*Cross-Sectional Area*, CSA) de las miofibras en la zona de la lesión (**II**: Fig. 3B) demostraron un importante incremento en el tamaño de las fibras que regeneran la zona de la lesión, especialmente en el grupo de animales tratados con ejercicio. A medida que las miofibras recién formadas maduran, van aumentando de tamaño; por lo que, el incremento del CSA observado en los tratamientos administrados, nos indica su potencial efecto en el crecimiento de las fibras musculares. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en los resultados del aumento de la fuerza muscular y en los niveles observados en la medida del marcador de regeneración dMHC y demuestran no sólo que la terapia basada en ejercicio físico acelera la recuperación muscular sino que la combinación de ambas terapias no produce un efecto sinérgico de manera que la administración de PRP no añade un efecto beneficioso al tratamiento basado en movilización activa temprana.

Una posible explicación de éste efecto sería que la rehabilitación activa temprana del músculo esquelético lesionado, desencadena una sustancial hipoxia en las fibras musculares esqueléticas lesionadas. Esta hipoxia induce la expresión de HIF-1 α en todas las células que sobreviven a dicha lesión, desencadenando a su vez la expresión de más de 80 factores de crecimiento y quimioquinas necesarias para la

angiogénesis (Beaudry et al. 2016; Semenza 2016). Este punto de vista está apoyado por estudios previos que han demostrado que la aceleración y la mejora de la regeneración del músculo esquelético por la rehabilitación activa temprana está relacionada con una inducción más prematura y pronunciada de la angiogénesis en el área lesionada (Järvinen et al. 2005).

El efecto terapéutico del ejercicio post-lesión puede ser debido a que la carga mecánica es un poderoso regulador del fenotipo celular, ya que está involucrada en múltiples funciones celulares, como la replicación, la orientación, la síntesis de colágeno (Bishop JE, Butt RP 1993) y la secreción de un gran número de factores de crecimiento, que a su vez estimulan su regeneración de forma auto- o paracrina (Kääriäinen et al. 2000; Kääriäinen et al. 2001; Kääriäinen et al. 2002). Por lo tanto, es probable que algunos de los factores de crecimiento contenidos en las inyecciones de PRP, puedan ser reemplazados por la inducción natural de estos mismos factores a través de la mecanotransducción. En este contexto, es necesario enfatizar que la carga mecánica ejercida por la rehabilitación activa temprana sobre el músculo esquelético lesionado, es crucial para la restauración de la integridad mecánica del músculo (Kääriäinen et al. 2000; Järvinen et al. 2005).

La carga mecánica es un factor indispensable en la expresión de las moléculas de adhesión que unen el músculo esquelético que se está regenerando y la matriz circundante; y es capaz de restaurar la resistencia mecánica de los tejidos lesionados más rápidamente que aquellos tratados con un estilo de vida sedentario o con inmovilización (Lehto, Sims, et al. 1985; Kääriäinen et al. 2001; Kääriäinen et al. 2002; Lehto, Duance, et al. 1985).

Así mismo, es posible que la liberación sostenida de los factores de crecimiento provenientes del PRP, pudieran interferir en la regeneración de las fibras musculoesqueléticas con la señal de mecanotransducción natural proporcionada por la rehabilitación activa temprana durante la reparación. Debido a que la liberación de factores de crecimiento derivados de plaquetas no se controla temporalmente, es teóricamente posible que en cierto punto del proceso regenerativo, se proporcionen estímulos opuestos; de proliferación por los factores de crecimiento derivados del PRP y al mismo tiempo, de diferenciación o adhesión por la carga mecánica. Esta podría ser la explicación molecular de por qué el PRP no proporciona ninguna

ventaja terapéutica para el músculo esquelético lesionado cuando se combina con la rehabilitación activa temprana.

6.3.1.3. Correlación de los resultados en el modelo animal con estudios en clínica humana

A pesar del amplio uso de las inyecciones de PRP, las investigaciones sobre su eficiencia clínica aún está en sus comienzos, por lo que se requiere aumentar el número de estudios para confirmar los prometedores resultados pre-clínicos ya existentes y proporcionar pruebas científicas más sólidas; ya que los hallazgos clínicos obtenidos hasta el momento, son contradictorios en la respuesta individual al tratamiento en lesiones deportivas (Kon et al. 2011; Stanco et al. 2012).

La bioseguridad de las inyecciones musculares de PRP en la práctica clínica, fue confirmada a través de dos ECAs (Tabla 5) (A Hamid et al. 2014; Reurink & Goudswaard 2014), en los cuales a pesar de mostrar resultados controvertidos, obtuvieron resultados idénticos con respecto al tiempo que los pacientes necesitaron hasta reanudar sus actividades deportivas; aunque sólo en uno de ellos (A Hamid et al. 2014) el PRP demostró su superioridad como terapia.

Tal y como hemos comentado con anterioridad, existen tres fuentes importantes de variabilidad en los estudios realizados con PRP, que podrían explicar la discrepancia de los resultados encontrados hasta el momento (Figura 12). No sólo existen diferencias en la composición de los productos de PRP, sino también en la dosificación de plaquetas y leucocitos, además de en las características de la lesión del tejido huésped. Así mismo, las comparaciones que se realizan entre estudios, en múltiples ocasiones son diferentes, por ejemplo, mientras que Reurink y colaboradores (Reurink & Goudswaard 2014) demostraron que dos inyecciones de PRP (intervalo entre inyecciones de 5-7 días) no fueron superiores a las inyecciones con salino, una única inyección de PRP con la fracción leucocitaria incluida, fue superior al grupo control tratado con un programa de rehabilitación (A Hamid et al. 2014). De hecho, cuando se comparan los regímenes de dosificación y los protocolos de aplicación, el PRP con dosis más altas de plaquetas y leucocitos resultó ser el ganador (A Hamid et al. 2014). Por tanto, a pesar de que se necesitarían más

estudios para corroborar estos resultados, suministrar una doble inyección de PRP, parece no tener ninguna ventaja (Reurink & Goudswaard 2014).

En nuestro estudio, hemos abordado los efectos individuales de la rehabilitación activa temprana y la inyección de PRP, así como su posible interacción en nuestro modelo experimental de lesión muscular en rata, que imita fielmente las lesiones observadas en los atletas. Tanto el ejercicio como las terapias basadas en PRP generan un efecto beneficioso en la regeneración muscular de la lesión. Nuestro estudio muestra que, aunque tanto el protocolo de rehabilitación activa temprana como el PRP mejoraron la reparación del músculo esquelético lesionado individualmente, el resultado de la rehabilitación activa temprana se ve afectado negativamente por la inyección de PRP cuando se combinan estas dos terapias.

De manera muy importante, nuestros datos pueden ayudar a esclarecer el por qué la administración de una inyección de PRP intramuscular a las 24 h post-lesión no añade un efecto beneficioso al tratamiento basado en movilización activa temprana, tal y como se ha descrito en los últimos ECA (Hamilton et al. 2015; Reurink et al. 2015), donde los atletas con lesión muscular fueron sometidos a protocolos de rehabilitación activa tras la inyección de PRP y donde se demostró que la terapia combinada no añade una mejora significativa al tratamiento basado exclusivamente en rehabilitación. Es importante destacar que el producto de PRP utilizado en nuestro estudio es un PRP rico en plaquetas y pobre en leucocitos, comparable por tanto a los productos de PRP utilizados en los dos ECA que obtuvieron resultados negativos para PRP (Hamilton et al. 2015; Reurink et al. 2015). A pesar de que se requieren más investigaciones, estos enfoques terapéuticos podrían abrir nuevas vías para el tratamiento de las lesiones del músculo esquelético humano y podrían ser útiles en el diseño y optimización de prácticas terapéuticas en la medicina deportiva.

6.3.2. Efectos terapéuticos del tratamiento de lesión muscular con GAG

La ECM es una estructura dinámica que posee funciones importantes en la señalización y el anclaje celular, manteniendo de este modo la homeostasis del tejido (Raghow 1994). Las 2 principales familias de GAG sulfatados en el músculo esquelético son el HS y el CS/DS (Zhang 2010; Handel et al. 2005). Están implicados

en una variedad de procesos fisiológicos a través de la activación, ensamblaje o protección de varias HBPs, que incluyen factores de crecimiento, quimioquinas, receptores de superficie celular y otros componentes de la ECM; formando parte de la regulación del desarrollo y la homeostasis tisular (Zhang 2010; Handel et al. 2005). Diversos estudios se han centrado en el papel de los PGs, como los sindecanos 3 y 4, durante la regeneración muscular, los cuales se hallan implicados en la activación de las SC y la formación de miofibras (Pisconti et al. 2012; Cornelison et al. 2001); así como en la decorina y el biglicano (ambos PGs que contienen CS y DS), en los cuales se ha visto un aumento de expresión en ratones *mdx* durante el proceso de evolución de la distrofia muscular (Casar et al. 2004; Cáceres et al. 2000), la cual se caracteriza por continuos episodios de necrosis-regeneración muscular.

Los compuestos CS y GLU están reconocidos como fármacos SYSADOA y su aplicación tiene un excelente perfil de seguridad, permitiendo su uso en el tratamiento a largo plazo. Los estudios tanto *in vitro*, *in vivo* como clínicos, apoyan la existencia de un efecto sinérgico de CS y GLU, por ello, decidimos administrar la combinación de ambos productos en los tratamientos tanto por vía oral como por inyección intraperitoneal en nuestro modelo experimental de rata, con el fin de evaluar los posibles efectos terapéuticos sobre la regeneración muscular.

6.3.2.1. Estudio funcional de recuperación de fuerza muscular

La medida de la funcionalidad del músculo demostró que el tratamiento de la combinación CS+GLU con ambos métodos de administración, oral e intraperitoneal, mejoraron significativamente la fuerza muscular tras un tratamiento diario durante 3 semanas post-lesión. La administración intraperitoneal de CS+GLU demostró un mayor incremento en la fuerza muscular (un incremento del 21% en comparación con los animales no tratados), mientras que la administración oral produjo un menor efecto mostrando un incremento del 16% en la recuperación de la TetF máxima (**III**: Fig. 1).

Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Hwang y colaboradores (Hwang et al. 2006), en los que observaron un incremento en la fuerza muscular a

30 días post-lesión tras la administración de decorina en un modelo de lesión muscular por laceración en ratas.

6.3.2.2. Evaluación histológica del efecto terapéutico de los tratamientos

La combinación de ambos compuestos, CS+GLU, tanto vía oral como por inyección intraperitoneal, indujeron un aumento de la deposición de CS en la zona de la lesión muscular que se está regenerando, demostrando la eficacia de ambas vías de administración en el aumento de los niveles de CS intramusculares (**III**: Fig. 2).

Sorprendentemente, observamos también un aumento concomitante en el crecimiento de las fibras musculares que están regenerando el tejido tras la administración de CS+GLU. Ambos tratamientos, por vía intraperitoneal y oral promovieron un importante aumento del CSA de las miofibras en comparación con animales no tratados (un incremento de 1,99 y 1,25 veces en los animales tratados intraperitoneal y oral, respectivamente) (**III**: Fig. 3B). Nuestros datos demuestran que la administración de la combinación de CS+GLU tiene un importante efecto beneficioso en la regeneración del músculo, estimulando la aceleración del proceso de reparación del músculo, así como de la recuperación funcional del músculo tratado.

Aunque en la literatura no se encuentran referencias de estudios previos sobre el efecto de la combinación CS+GLU en la regeneración muscular; Ghaliani y colaboradores, realizaron estudios *in vitro* sobre el efecto de otro GAG, el HS, en la diferenciación de las SC y en la señalización de FGF-2 (Ghadiali et al. 2017). La adición de un mimético de HS en cultivos de SC, dio como resultado un aumento en la diferenciación de éstas y una inhibición de la señalización de FGF-2, un importante promotor de la proliferación de las SC e inhibidor de la diferenciación celular (Rapraeger et al. 1991; Olwin & Rapraeger 1992); a través de la vía de señalización de Erk 1/2, quinasas reguladas por señales extracelulares.

Se ha estudiado también la administración de biglicano en ratones *mdx*, donde ha demostrado su eficacia como tratamiento en el aumento de la expresión de utrofina así como en la mejora de los déficits motores, el aumento en el número de

mionúcleos centrales y en la distribución del tamaño de las miofibras (Ito et al. 2017). Por otro lado, en un estudio realizado por Pereira et al (Pereira, Baptista, et al. 2014), se observó un aumento en el CSA de las miofibras en ratas tratadas con leucina, aminoácido esencial para la formación de la familia de pequeños proteoglicanos ricos en leucina, que se unen a los GAG, CS y/o DS, para formar PGs como decorina y biglicano. Éste tratamiento evitó la fatiga en los músculos lesionados, indicando que el aumento en el CSA a través de la leucina fue relevante para la función muscular. Alternativamente, el mecanismo del aumento en el calibre de las miofibras asociado con la leucina durante la regeneración podría implicar un aumento en la proliferación de las MPC, dado que se ha demostrado que la leucina aumenta la proliferación *in vitro* de las SC en cerdos (Suryawan et al. 2008).

Por lo tanto, es posible que los PGs puedan modular los procesos de proliferación y diferenciación de las MPC, debido a la capacidad de éstos para unirse a diferentes factores de crecimiento y citoquinas durante el proceso de regeneración muscular. Se ha observado que el tratamiento con GAG en ratas lesionadas, incrementó los niveles de IGF-I en el músculo re-inervado e impidió la atrofia de fibras musculares, indicando que los GAG poseen una importante función en la reinervación de las fibras musculares (Gorio et al. 1998). Así mismo, se ha descrito que el biglicano, desempeña un papel importante en la estabilidad de las sinapsis neuromusculares (Amenta et al. 2012).

A pesar de que el mecanismo molecular por el que el CS promueve la regeneración muscular, como muestran nuestros resultados, no se conoce; una de las posibles explicaciones se basa en la modificación de la proporción de los GAGs en la composición de la ECM en los músculos tratados a consecuencia de la administración de los tratamientos con CS+GLU. Este hecho, podría modificar las señales recibidas por las células que participan en la regeneración muscular durante las fases de inflamación, reparación o remodelación y, por tanto, estimular el proceso de recuperación muscular.

Otra posible explicación es que el aumento de los niveles de ciertos GAG en el área del músculo lesionado puede estimular la reinervación de las fibras musculares que se están regenerando y acelerar el crecimiento y la maduración de la fibra muscular,

lo que justificaría el aumento detectado en el tamaño de las fibras musculares tras los tratamientos con CS+GLU.

Por último, evaluamos el grado de fibrosis tras el tratamiento con CS+GLU, con el objetivo de determinar la deposición de tejido conjuntivo intramuscular. Nuestros resultados demostraron un claro efecto anti-fibrótico en las áreas del músculo en regeneración, donde el colágeno I se redujo significativamente 3 semanas después de la aplicación de los tratamientos, tanto en administración por vía intraperitoneal como oral (28% y 21% de disminución de la deposición de colágeno I intramuscular, respectivamente) (**III: Fig. 3C**).

Estos datos demuestran el efecto beneficioso de los PGs en la prevención de la fibrosis y la cicatrización, correlacionándose además con los resultados obtenidos en las medidas de fuerza muscular. Estos resultados, corroboran los estudios realizados por Kaasik y colaboradores (Kaasik et al. 2011), en los que mostraron que las alteraciones en la estructura de la ECM en el músculo esquelético están relacionadas con los cambios en la fuerza muscular y la actividad motora.

Por otro lado, la ECM junto con TGF- β , juegan un papel importante en el control del crecimiento y la diferenciación muscular. Los PGs de la ECM como la decorina, el biglicano y los betaglicanos poseen la capacidad de unir TGF- β durante la diferenciación del músculo esquelético; disminuyendo la biodisponibilidad del TGF- β para sus receptores y convirtiéndose en un mecanismo de atenuación de su actividad durante la formación del músculo esquelético (Droguett et al. 2006). Así mismo, se ha demostrado en diferentes modelos animales que la decorina es capaz de reducir la fibrosis tisular y la inflamación causada por TGF- β (Zhu et al. 2007; Järvinen & Ruoslahti 2013). Se ha observado además, que la decorina también se une y neutraliza a otro miembro de la superfamilia TGF- β , la miostatina, capaz de inducir fibrosis y bloquear la diferenciación del tejido (Zhu et al. 2007).

Por tanto, nuestros datos obtenidos en el modelo experimental en rata demuestran el efecto terapéutico de la administración del tratamiento combinado de CS+GLU, lo que puede representar una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de las lesiones musculares en clínica humana. De esta forma, el conocimiento de los mecanismos moleculares mediante los cuales CS y GLU mejoran el proceso de

regeneración muscular y previenen efectos adversos como la fibrosis intramuscular podría proporcionar evidencia científica sobre el mecanismo de acción de los GAGs sulfatados exógenos en el músculo esquelético y generar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de las lesiones del músculo esquelético en la práctica clínica y, en especial, en la medicina deportiva.

7. CONCLUSIONES

1. Se ha establecido con éxito un nuevo modelo de lesión quirúrgica muscular inducida en ratas, fácil de generar, altamente reproducible y capaz de imitar las lesiones más frecuentes del músculo esquelético observadas en la clínica deportiva humana.
2. Nuestros resultados demuestran el efecto terapéutico de la administración de una dosis única de PRP mediante inyección intramuscular y, especialmente de la rehabilitación activa temprana (basada en el ejercicio), en la recuperación muscular, tanto a nivel histológico como en la recuperación de la fuerza del músculo esquelético lesionado en nuestro modelo experimental en ratas.
3. No se observó un efecto sinérgico en la combinación de ambos tratamientos, lo que sugiere que el PRP no añade ningún efecto beneficioso al tratamiento basado en el ejercicio en el músculo esquelético lesionado.
4. Nuestros resultados corroboran la falta de sinergia del PRP con respecto a la rehabilitación por actividad física de mostrada en los últimos ECA realizados en clínica humana, donde los atletas fueron sometidos a protocolos de rehabilitación basados en el principio de movilización activa temprana tras la administración de una dosis única de PRP intramuscular.
5. El tratamiento combinado de CS y GLU demostró tener un efecto beneficioso en la regeneración del músculo esquelético lesionado en el modelo de lesión muscular en rata, tanto a nivel histológico como en la recuperación de la fuerza muscular, corroborando el papel clave de los componentes de la ECM durante el desarrollo muscular y la regeneración.
6. A pesar de que se requieren más investigaciones, estos enfoques terapéuticos podrían abrir nuevas vías en el tratamiento de las lesiones del músculo esquelético humano y especialmente en el campo de la medicina deportiva.

8. BIBLIOGRAFÍA

- A Hamid, M.S. et al., 2014. Platelet-Rich Plasma Injections for the Treatment of Hamstring Injuries. *The American Journal of Sports Medicine*, 42(10), pp.2410–2418.
- Aärimaa, V. et al., 2004. Mild eccentric stretch injury in skeletal muscle causes transient effects on tensile load and cell proliferation. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 14(6), pp.367–72.
- Alberts, B. et al., 2007. *Molecular Biology of the Cell* Garland Sc., London.
- Ali, K. & Leland, J.M., 2012. Hamstring strains and tears in the athlete. *Clinics in sports medicine*, 31(2), pp.263–72.
- Allen, R.E. et al., 1995. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *Journal of cellular physiology*, 165(2), pp.307–12.
- Allen, R.E. & Boxhorn, L.K., 1989. Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *Journal of cellular physiology*, 138(2), pp.311–5.
- Almekinders, L.C., 1999. Anti-inflammatory treatment of muscular injuries in sport. An update of recent studies. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 28(6), pp.383–8.
- Almekinders, L.C., 1991. Results of surgical repair versus splinting of experimentally transected muscle. *Journal of orthopaedic trauma*, 5(2), pp.173–6.
- Amenta, A.R. et al., 2012. Biglycan is an extracellular MuSK binding protein important for synapse stability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(7), pp.2324–34.
- Andersen, J.L., Schjerling, P. & Saltin, B., 2000. Muscle, genes and athletic performance. *Scientific American*, 283(3), pp.48–55.
- Andia, I. & Abate, M., 2015. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(7), pp.987–999.
- Andia, I. & Maffulli, N., 2017. Biological Therapies in Regenerative Sports Medicine. *Sports Medicine*, 47(5), pp.807–828.
- Andia, I. & Maffulli, N., 2013. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 9(12), pp.721–730.
- Andia, I., Sánchez, M. & Maffulli, N., 2011. Platelet rich plasma therapies for sports muscle injuries: any evidence behind clinical practice? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(4), pp.509–518.
- Aoto, K. et al., 2014. Circadian variation of growth factor levels in platelet-rich plasma. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*, 24(6), pp.509–12.

- Arnold, L. et al., 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine*, 204(5), pp.1057–69.
- Arsic, N. et al., 2004. Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(5), pp.844–54.
- Askling, C., Saartok, T. & Thorstensson, A., 2006. Type of acute hamstring strain affects flexibility, strength, and time to return to pre-injury level. *British journal of sports medicine*, 40(1), pp.40–4.
- Askling, C.M. et al., 2007. Acute first-time hamstring strains during slow-speed stretching: clinical, magnetic resonance imaging, and recovery characteristics. *The American journal of sports medicine*, 35(10), pp.1716–24.
- Askling, C.M. et al., 2014. Acute hamstring injuries in Swedish elite sprinters and jumpers: a prospective randomised controlled clinical trial comparing two rehabilitation protocols. *British journal of sports medicine*, 48(7), pp.532–9.
- Askling, C.M. et al., 2008. Proximal hamstring strains of stretching type in different sports: injury situations, clinical and magnetic resonance imaging characteristics, and return to sport. *The American journal of sports medicine*, 36(9), pp.1799–804.
- Askling, C.M., Malliaropoulos, N. & Karlsson, J., 2012. High-speed running type or stretching-type of hamstring injuries makes a difference to treatment and prognosis. *British Journal of Sports Medicine*, 46(2), pp.86–87.
- Aspelin, P. et al., 1992. Ultrasound examination of soft tissue injury of the lower limb in athletes. *The American journal of sports medicine*, 20(5), pp.601–3.
- Baeza-Raja, B. & Muñoz-Cánoves, P., 2004. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Molecular biology of the cell*, 15(4), pp.2013–26.
- Bahlmann, F.H. et al., 2004. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 103(3), pp.921–6.
- Baker, K.G., Robertson, V.J. & Duck, F.A., 2001. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Physical therapy*, 81(7), pp.1351–8.
- Balius, R. et al., 2009. Central aponeurosis tears of the rectus femoris: practical sonographic prognosis. *British journal of sports medicine*, 43(11), pp.818–24.
- Baltgalvis, K.A. et al., 2012. Exercise training improves plantar flexor muscle function in mdx mice. *Medicine and science in sports and exercise*, 44(9), pp.1671–9.
- Baoge, L. et al., 2012. Treatment of skeletal muscle injury: a review. *ISRN orthopedics*, 2012, p.689012.

- Barr, K.P., 2007. Review of Upper and Lower Extremity Musculoskeletal Pain Problems. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 18(4), pp.747–760.
- Bazgir, B. et al., 2017. Satellite Cells Contribution to Exercise Mediated Muscle Hypertrophy and Repair. *Cell journal*, 18(4), pp.473–484.
- Beaudry, M. et al., 2016. Regulation of myogenesis by environmental hypoxia. *Journal of cell science*, 129(15), pp.2887–96.
- Bedair, H. et al., 2007. Matrix metalloproteinase-1 therapy improves muscle healing. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 102(6), pp.2338–45.
- Beiner, J.M. et al., 1999. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *The American journal of sports medicine*, 27(1), pp.2–9.
- Beltran, L. et al., 2012. The proximal hamstring muscle-tendon-bone unit: a review of the normal anatomy, biomechanics, and pathophysiology. *European journal of radiology*, 81(12), pp.3772–9.
- Bennett, M. et al., 2005. Hyperbaric oxygen therapy for delayed onset muscle soreness and closed soft tissue injury. M. H. Bennett, ed. *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), p.CD004713.
- Bentzinger, C.F., von Maltzahn, J. & Rudnicki, M.A., 2010. Extrinsic regulation of satellite cell specification. *Stem cell research & therapy*, 1(3), p.27.
- Berkes, C.A. & Tapscott, S.J., 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 16(4–5), pp.585–95.
- Best, T.M. et al., 1998. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute muscle stretch injuries. Results in an animal model. *The American journal of sports medicine*, 26(3), pp.367–72.
- Best, T.M., Gharaibeh, B. & Huard, J., 2013. Stem cells, angiogenesis and muscle healing: a potential role in massage therapies? *British journal of sports medicine*, 47(9), pp.556–60.
- Best, T.M. & Hunter, K.D., 2000. Muscle injury and repair. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*, 11(2), pp.251–66.
- Bianchi, S. et al., 1998. Sonographic evaluation of tears of the gastrocnemius medial head ("tennis leg"). *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 17(3), pp.157–62.
- Bischoff, R., 1994. *The satellite cell and muscle regeneration*. In *Myogenesis* McGraw-Hil. A. G. Engel and C. Franzini-Armstrong., ed., New York.
- Bischoff, R. & Heintz, C., 1994. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 201(1), pp.41–54.

- Bishop JE, Butt RP, L.G., 1993. The role of mechanical force in the regulation of fibroblasts function: implications for enhanced collagen deposition during pulmonary vascular remodelling. *Eur Respir Rev*, (3), pp.613–7.
- Bleakley, C., McDonough, S. & MacAuley, D., 2004. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *The American journal of sports medicine*, 32(1), pp.251–61.
- Border, W.A. & Ruoslahti, E., 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *The Journal of clinical investigation*, 90(1), pp.1–7.
- Brandan, E. & Inestrosa, N.C., 1987. Isolation of the heparan sulfate proteoglycans from the extracellular matrix of rat skeletal muscle. *Journal of neurobiology*, 18(3), pp.271–82.
- Braun, T. et al., 1989. Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *The EMBO journal*, 8(12), pp.3617–25.
- Brooke, M.H. & Kaiser, K.K., 1974. Trophic functions of the neuron. II. Denervation and regulation of muscle. The use and abuse of muscle histochemistry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 228(0), pp.121–44.
- Brooks, J.H.M. et al., 2006. Incidence, risk, and prevention of hamstring muscle injuries in professional rugby union. *The American journal of sports medicine*, 34(8), pp.1297–306.
- Brooks, S. V, Zerba, E. & Faulkner, J.A., 1995. Injury to muscle fibres after single stretches of passive and maximally stimulated muscles in mice. *The Journal of physiology*, pp.459–69.
- Brunelli, S. & Rovere-Querini, P., 2008. The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacological research*, 58(2), pp.117–21.
- Brutsaert, T.D. et al., 2002. Regional differences in expression of VEGF mRNA in rat gastrocnemius following 1 hr exercise or electrical stimulation. *BMC physiology*, 2, p.8.
- Bubnov, R., Yevseenko, V. & Semeniv, I., 2013. Ultrasound guided injections of platelets rich plasma for muscle injury in professional athletes. Comparative study. *Medical ultrasonography*, 15(2), pp.101–5.
- Buckingham, M. et al., 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of anatomy*, 202(1), pp.59–68.
- Buckwalter, J.A., 1995. Should bone, soft-tissue, and joint injuries be treated with rest or activity? *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 13(2), pp.155–6.
- Bush, C.H., 2000. The magnetic resonance imaging of musculoskeletal hemorrhage. *Skeletal radiology*, 29(1), pp.1–9.

- Butterfield, T.A. & Herzog, W., 2006. Effect of altering starting length and activation timing of muscle on fiber strain and muscle damage. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(5), pp.1489–98.
- Cáceres, S. et al., 2000. Synthesis of proteoglycans is augmented in dystrophic mdx mouse skeletal muscle. *European journal of cell biology*, 79(3), pp.173–81.
- Carling, C., Le Gall, F. & Orhant, E., 2011. A four-season prospective study of muscle strain reoccurrences in a professional football club. *Research in sports medicine (Print)*, 19(2), pp.92–102.
- Carlson, B.M. & Faulkner, J.A., 1983. The regeneration of skeletal muscle fibers following injury: a review. *Medicine and science in sports and exercise*, 15(3), pp.187–98.
- Carvalho, N. et al., 2010. Protective effects of therapeutic cold and heat against the oxidative damage induced by a muscle strain injury in rats. *Journal of sports sciences*, 28(9), pp.923–35.
- Casar, J.C. et al., 2004. Transient up-regulation of biglycan during skeletal muscle regeneration: delayed fiber growth along with decorin increase in biglycan-deficient mice. *Developmental biology*, 268(2), pp.358–71.
- Chan, O. et al., 2012. Acute muscle strain injuries: a proposed new classification system. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 20(11), pp.2356–62.
- Chan, P.-S., Caron, J.P. & Orth, M.W., 2006. Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *The Journal of rheumatology*, 33(7), pp.1329–40.
- Chan, P.S. et al., 2005. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. *Osteoarthritis and cartilage*, 13(5), pp.387–94.
- Chan, Y.-S. et al., 2003. Antifibrotic effects of suramin in injured skeletal muscle after laceration. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 95(2), pp.771–80.
- Chan, Y.-S. et al., 2005. The use of suramin, an antifibrotic agent, to improve muscle recovery after strain injury. *The American journal of sports medicine*, 33(1), pp.43–51.
- Chargé, S.B.P. & Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews*, 84(1), pp.209–38.
- Chazaud, B. et al., 2009. Dual and beneficial roles of macrophages during skeletal muscle regeneration. *Exercise and sport sciences reviews*, 37(1), pp.18–22.
- Chazaud, B., 2014. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*, 219(3), pp.172–8.

- Chazaud, B. et al., 2003. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *The Journal of cell biology*, 163(5), pp.1133–43.
- Chen, S.-E. et al., 2005. Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 289(5), pp.C1179–87.
- Chevalier, F. et al., 2015. A fine structural modification of glycosaminoglycans is correlated with the progression of muscle regeneration after ischaemia: towards a matrix-based therapy? *European cells & materials*, 30, pp.51–68.
- Christ, B. & Ordahl, C.P., 1995. Early stages of chick somite development. *Anatomy and embryology*, 191(5), pp.381–96.
- Christov, C. et al., 2007. Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Molecular biology of the cell*, 18(4), pp.1397–409.
- Ciciliot, S. & Schiaffino, S., 2010. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Current pharmaceutical design*, 16(8), pp.906–14.
- Cisterna, B. et al., 2016. Adapted physical exercise enhances activation and differentiation potential of satellite cells in the skeletal muscle of old mice. *Journal of anatomy*, 228(5), pp.771–83.
- Clegg, D.O. et al., 2006. Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis. *New England Journal of Medicine*, 354(8), pp.795–808.
- Cobley, J.N. et al., 2015. Exercise improves mitochondrial and redox-regulated stress responses in the elderly: better late than never! *Biogerontology*, 16(2), pp.249–64.
- Cocks, M. & Wagenmakers, A.J.M., 2016. The effect of different training modes on skeletal muscle microvascular density and endothelial enzymes controlling NO availability. *The Journal of physiology*, 594(8), pp.2245–57.
- Cohen, S.B. et al., 2011. Hamstring injuries in professional football players: magnetic resonance imaging correlation with return to play. *Sports health*, 3(5), pp.423–30.
- Collins, C.A. et al., 2005. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 122(2), pp.289–301.
- Comin, J. et al., 2013. Return to competitive play after hamstring injuries involving disruption of the central tendon. *The American journal of sports medicine*, 41(1), pp.111–5.
- Connell, D.A. et al., 2004. Longitudinal study comparing sonographic and MRI assessments of acute and healing hamstring injuries. *AJR. American journal of*

- roentgenology*, 183(4), pp.975–84.
- Cornelison, D.D. et al., 2001. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Developmental biology*, 239(1), pp.79–94.
- Corona, B.T. et al., 2013. The promotion of a functional fibrosis in skeletal muscle with volumetric muscle loss injury following the transplantation of muscle-ECM. *Biomaterials*, 34(13), pp.3324–35.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S. & Buckingham, M., 1996. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends in genetics : TIG*, 12(6), pp.218–23.
- Costa, A. et al., 2007. Impact of repeated bouts of eccentric exercise on myogenic gene expression. *European journal of applied physiology*, 101(4), pp.427–36.
- Creaney, L. & Hamilton, B., 2008. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *British journal of sports medicine*, 42(5), pp.314–20.
- Crisco, J.J. et al., 1994. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *The American journal of sports medicine*, 22(5), pp.702–10.
- Crisco, J.J. et al., 1996. Maximal contraction lessens impact response in a muscle contusion model. *Journal of biomechanics*, 29(10), pp.1291–6.
- Croisier, J.-L., 2004. Factors associated with recurrent hamstring injuries. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 34(10), pp.681–95.
- Croisier, J.-L. et al., 2002. Hamstring muscle strain recurrence and strength performance disorders. *The American journal of sports medicine*, 30(2), pp.199–203.
- Cross, T.M. et al., 2004. Acute quadriceps muscle strains: magnetic resonance imaging features and prognosis. *The American journal of sports medicine*, 32(3), pp.710–9.
- Cunha, R., 2014. Effect of platelet-rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. *Transplant Proc.*, 46(6), pp.1879–81.
- D’Albis, A. et al., 1988. Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *European journal of biochemistry / FEBS*, 174(1), pp.103–10.
- Dahmer, S. & Schiller, R.M., 2008. Glucosamine. *American family physician*, 78(4), pp.471–6.
- Darr, K.C. & Schultz, E., 1987. Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 63(5), pp.1816–21.

- Deal, D.N. et al., 2002. Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 84-A(9), pp.1573–8.
- Delgado, G.J. et al., 2002. Tennis leg: clinical US study of 141 patients and anatomic investigation of four cadavers with MR imaging and US. *Radiology*, 224(1), pp.112–9.
- Delos, D., Maak, T.G. & Rodeo, S.A., 2013. Muscle injuries in athletes: enhancing recovery through scientific understanding and novel therapies. *Sports health*, 5(4), pp.346–52.
- Denapoli, P.M.A. et al., 2016. Platelet-Rich Plasma in a Murine Model: Leukocytes, Growth Factors, Flt-1, and Muscle Healing. *The American journal of sports medicine*, 44(8), pp.1962–71.
- Derbre, F. et al., 2012. Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. I. E. Gallouzi, ed. *PLoS one*, 7(10), p.e46668.
- Desmoulière, A. & Gabbiani, G., 1995. Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Experimental nephrology*, 3(2), pp.134–9.
- Dhawan, J. & Rando, T.A., 2005. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends in cell biology*, 15(12), pp.666–73.
- Dohan Ehrenfest, D.M., Rasmusson, L. & Albrektsson, T., 2009. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*, 27(3), pp.158–67.
- Doucet, B.M., Lam, A. & Griffin, L., 2012. Neuromuscular electrical stimulation for skeletal muscle function. *The Yale journal of biology and medicine*, 85(2), pp.201–15.
- Droguett, R. et al., 2006. Extracellular proteoglycans modify TGF-beta bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 25(6), pp.332–41.
- Duan, C. et al., 1990. Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca²⁺] and injury from downhill walking. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 68(3), pp.1241–51.
- Dumont, N.A., Wang, Y.X. & Rudnicki, M.A., 2015. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development (Cambridge, England)*, 142(9), pp.1572–81.
- Eirale, C. et al., 2013. Low injury rate strongly correlates with team success in Qatari professional football. *British journal of sports medicine*, 47(12), pp.807–8.
- Ekstrand, J. et al., 2012. Hamstring muscle injuries in professional football: the

- correlation of MRI findings with return to play. *British journal of sports medicine*, 46(2), pp.112–7.
- Ekstrand, J., Hägglund, M. & Waldén, M., 2011. Epidemiology of Muscle Injuries in Professional Football (Soccer). *The American Journal of Sports Medicine*, 39(6), pp.1226–1232.
- Ekstrand, J., Hägglund, M. & Waldén, M., 2011. Injury incidence and injury patterns in professional football: the UEFA injury study. *British journal of sports medicine*, 45(7), pp.553–8.
- El-Sharkawy, H. et al., 2007. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *Journal of periodontology*, 78(4), pp.661–9.
- ElMaraghy, A.W. & Devereaux, M.W., 2012. A systematic review and comprehensive classification of pectoralis major tears. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 21(3), pp.412–22.
- Engelbrechtsen, L. et al., 2010. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *British journal of sports medicine*, 44(15), pp.1072–81.
- Eppley, B.L., Woodell, J.E. & Higgins, J., 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 114(6), pp.1502–8.
- Fandrey, J., 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(6), pp.R977–88.
- Faria, F.E.T. et al., 2008. The onset and duration of mobilization affect the regeneration in the rat muscle. *Histology and histopathology*, 23(5), pp.565–71.
- Farrag, T.Y. et al., 2007. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *The Laryngoscope*, 117(1), pp.157–65.
- Feng, X., Li, G. & Wang, S., 2004. Effects of estrogen on gastrocnemius muscle strain injury and regeneration in female rats. *Acta pharmacologica Sinica*, 25(11), pp.1489–94.
- Fielding, R.A. et al., 1993. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *The American journal of physiology*, 265(1 Pt 2), pp.R166–72.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z. & Coolican, S.A., 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine reviews*, 17(5), pp.481–517.
- Floss, T., Arnold, H.H. & Braun, T., 1997. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration. *Genes & development*, 11(16), pp.2040–51.
- Forsythe, J.A. et al., 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene

- transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology*, 16(9), pp.4604–13.
- Foster, T.E. et al., 2009. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American journal of Sports Medicine*, 37(11), pp.2259–2272.
- Foster, W. et al., 2003. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 21(5), pp.798–804.
- Fowlkes, J.L. et al., 2004. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I action by matrix metalloproteinase-3 involves selective disruption of IGF-I/IGF-binding protein-3 complexes. *Endocrinology*, 145(2), pp.620–6.
- Fridén, J. & Lieber, R.L., 1998. Segmental muscle fiber lesions after repetitive eccentric contractions. *Cell and tissue research*, 293(1), pp.165–71.
- Fujimaki, S. et al., 2013. Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to the establishment of pluripotent stem cells. *Stem cells international*, 2013, p.420164.
- Fukushima, K. et al., 2001. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *The American journal of sports medicine*, 29(4), pp.394–402.
- Gal-Levi, R. et al., 1998. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Biochimica et biophysica acta*, 1402(1), pp.39–51.
- Garrett, W.E. et al., 1987. Biomechanical comparison of stimulated and nonstimulated skeletal muscle pulled to failure. *The American journal of sports medicine*, 15(5), pp.448–54.
- Garrett, W.E. et al., 1989. Computed tomography of hamstring muscle strains. *Medicine and science in sports and exercise*, 21(5), pp.506–14.
- Garrett, W.E., Califf, J.C. & Bassett, F.H., 1984. Histochemical correlates of hamstring injuries. *The American journal of sports medicine*, 12(2), pp.98–103.
- Garrett WE Jr, B.T., 1994. Anatomy, physiology, and mechanics of skeletal muscle. In Simon SR, ed. *Orthopaedic basic science*. pp. 89–125.
- Gavin, T.P., Westerkamp, L.M. & Zwetsloot, K.A., 2006. Soleus, plantaris and gastrocnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 188(2), pp.113–21.
- Germani, A. et al., 2003. Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *The American journal of pathology*, 163(4), pp.1417–28.
- Ghadiali, R.S. et al., 2017. Dynamic changes in heparan sulfate during muscle

- differentiation and ageing regulate myoblast cell fate and FGF2 signalling. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 59, pp.54–68.
- Ghaly, A. & Marsh, D.R., 2010. Aging-associated oxidative stress modulates the acute inflammatory response in skeletal muscle after contusion injury. *Experimental gerontology*, 45(5), pp.381–8.
- Gibala, M.J. et al., 1995. Changes in human skeletal muscle ultrastructure and force production after acute resistance exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 78(2), pp.702–8.
- Gillies, A.R. & Lieber, R.L., 2011. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve*, 44(3), pp.318–31.
- Gollnick, P.D. et al., 1973. Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*, 34(1), pp.107–11.
- Gorio, A. et al., 1998. Muscle reinnervation following neonatal nerve crush. Interactive effects of glycosaminoglycans and insulin-like growth factor-I. *Neuroscience*, 82(4), pp.1029–37.
- Gorospe, J.R.M., Nishikawa, B.K. & Hoffman, E.P., 1996. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *Journal of the Neurological Sciences*, 135, pp.10–17.
- Gossett, L.A. et al., 1989. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Molecular and cellular biology*, 9(11), pp.5022–33.
- Gregory, T.M., Heckmann, R.A. & Francis, R.S., 1995. The effect of exercise on the presence of leukocytes, erythrocytes and collagen fibers in skeletal muscle after contusion. *Journal of manipulative and physiological therapeutics*, 18(2), pp.72–8.
- Gros, J. et al., 2005. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*, 435(7044), pp.954–8.
- Gros, J., Scaal, M. & Marcelle, C., 2004. A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Developmental cell*, 6(6), pp.875–82.
- Grounds, M.D. & Yablonka-Reuveni, Z., 1993. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Molecular and cell biology of human diseases series*, 3, pp.210–56.
- Guerrero, M. et al., 2008. Fast and slow myosins as markers of muscle injury. *British journal of sports medicine*, 42(7), p.581–4; discussion 584.
- Gür, H. et al., 2003. Relationship between in vivo muscle force at different speeds of isokinetic movements and myosin isoform expression in men and women. *European journal of applied physiology*, 88(6), pp.487–96.

- Gustafsson, B. & Pinter, M.J., 1985. Factors determining the variation of the afterhyperpolarization duration in cat lumbar alpha-motoneurons. *Brain research*, 326(2), pp.392–5.
- Hägglund, M. et al., 2013. Injuries affect team performance negatively in professional football: an 11-year follow-up of the UEFA Champions League injury study. *British journal of sports medicine*, 47(12), pp.738–42.
- Halfter, W. et al., 1998. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *The Journal of biological chemistry*, 273(39), pp.25404–12.
- Hamilton, B. et al., 2014. Classification and grading of muscle injuries: a narrative review. *British Journal of Sports Medicine*, 49, p.306.
- Hamilton, B. et al., 2015. Platelet-rich plasma does not enhance return to play in hamstring injuries: a randomised controlled trial. *British journal of sports medicine*, 49(14), pp.943–50.
- Hammond, J.W. et al., 2009. Use of Autologous Platelet-rich Plasma to Treat Muscle Strain Injuries. *The American Journal of Sports Medicine*, 37(6), pp.1135–1142.
- Handel, T.M. et al., 2005. REGULATION OF PROTEIN FUNCTION BY GLYCOSAMINOGLYCANS—AS EXEMPLIFIED BY CHEMOKINES. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), pp.385–410.
- Hanson, J. & Huxley, H.E., 1953. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature*, 172(4377), pp.530–2.
- Hardingham, T.E. & Fosang, A.J., 1992. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(3), pp.861–70.
- Harris, J.B. & Johnson, M.A., 1978. Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 5(6), pp.587–600.
- Harrison, P.J. & Johannisson, T., 1983. Segmental actions of afferents of the interosseous nerve in the cat. *The Journal of physiology*, 345, pp.373–89.
- Hawke, T.J. & Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(2), pp.534–51.
- He, L. et al., 2008. Effect of energy compound on skeletal muscle strain injury and regeneration in rats. *Industrial health*, 46(5), pp.506–12.
- Heiderscheit, B.C. et al., 2010. Hamstring strain injuries: recommendations for diagnosis, rehabilitation, and injury prevention. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, 40(2), pp.67–81.

- Hellsten, Y. et al., 1996. Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans. *Acta physiologica Scandinavica*, 157(2), pp.191–7.
- Henneman, E., 1957. Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science (New York, N.Y.)*, 126(3287), pp.1345–7.
- Hochberg, M.C. et al., 2016. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. *Annals of the rheumatic diseases*, 75(1), pp.37–44.
- Hooiveld, M.J.J. et al., 2003. Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood-induced joint damage: an in vitro study. *Rheumatology (Oxford, England)*, 42(6), pp.784–90.
- Huard, J., Li, Y. & Fu, F.H., 2002a. Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 84–A(5), pp.822–32.
- Huard, J., Li, Y. & Fu, F.H., 2002b. Muscle injuries and repair: current trends in research. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 84–A(5), pp.822–32.
- Hulmi, J.J. et al., 2007. Postexercise myostatin and activin IIB mRNA levels: effects of strength training. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(2), pp.289–97.
- Hurme, T. et al., 1991. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Medicine and science in sports and exercise*, 23(7), pp.801–10.
- Huxley, A.F., 2000. Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns. *Journal of biomechanics*, 33(10), pp.1189–95.
- Hwang, J.H. et al., 2006. Therapeutic effect of passive mobilization exercise on improvement of muscle regeneration and prevention of fibrosis after laceration injury of rat. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 87(1), pp.20–6.
- Ingalls, C.P., Warren, G.L., Williams, J.H., et al., 1998. E-C coupling failure in mouse EDL muscle after in vivo eccentric contractions. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 85(1), pp.58–67.
- Ingalls, C.P., Warren, G.L. & Armstrong, R.B., 1998. Dissociation of force production from MHC and actin contents in muscles injured by eccentric contractions. *Journal of muscle research and cell motility*, 19(3), pp.215–24.
- Irintchev, A. & Wernig, A., 1987. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. *Cell and tissue research*, 249(3), pp.509–21.
- Irrcher, I. et al., 2003. Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by

- endurance exercise. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 33(11), pp.783–93.
- Ito, M. et al., 2017. Protein-Anchoring Therapy of Biglycan for Mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Human gene therapy*, 28(5), pp.428–436.
- Jackson, D.W. & Feagin, J.A., 1973. Quadriceps contusions in young athletes. Relation of severity of injury to treatment and prognosis. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 55(1), pp.95–105.
- Järveläinen, H. et al., 2009. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 61(2), pp.198–223.
- Järvinen, M., 1975. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 2. a histological study of the effect of early mobilization and immobilization on the repair processes. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology*, 83(3), pp.269–82.
- Järvinen, M., 1976a. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 3. A micro-angiographical study of the effect of early mobilization and immobilization on capillary ingrowth. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Section A, Pathology*, 84(1), pp.85–94.
- Järvinen, M., 1976b. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 4. Effect of early mobilization and immobilization on the tensile properties of gastrocnemius muscle. *Acta chirurgica Scandinavica*, 142(1), pp.47–56.
- Järvinen, M.J. & Lehto, M.U., 1993. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 15(2), pp.78–89.
- Järvinen, T.A. et al., 2000. Muscle strain injuries. *Current opinion in rheumatology*, 12(2), pp.155–61.
- Järvinen, T.A., Järvinen, M. & Kalimo, H., 2013. Regeneration of injured skeletal muscle after the injury. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 3(4), pp.337–45.
- Järvinen, T.A.H. et al., 2005. Muscle injuries: biology and treatment. *The American journal of sports medicine*, 33(5), pp.745–64.
- Järvinen, T.A.H. et al., 2007. Muscle injuries: optimising recovery. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 21(2), pp.317–31.
- Järvinen, T.A.H. & Prince, S., 2015. Decorin: A Growth Factor Antagonist for Tumor Growth Inhibition. *BioMed research international*, 2015, p.654765.
- Järvinen, T.A.H. & Ruoslahti, E., 2010. Target-seeking antifibrotic compound enhances wound healing and suppresses scar formation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), pp.21671–6.
- Järvinen, T.A.H. & Ruoslahti, E., 2013. Targeted Antiscarring Therapy for Tissue

- Injuries. *Advances in wound care*, 2(2), pp.50–54.
- Joubert, Y. & Tobin, C., 1995. Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Developmental biology*, 169(1), pp.286–94.
- Józsa, L. et al., 1980. Alterations of oxygen and carbon dioxide tensions in crush-injured calf muscles of rat. *Zeitschrift für experimentelle Chirurgie*, 13(2), pp.91–4.
- Juhas, M. & Bursac, N., 2013. Engineering skeletal muscle repair. *Current opinion in biotechnology*, 24(5), pp.880–6.
- Kääriäinen, M. et al., 2002. Expression of alpha7beta1 integrin splicing variants during skeletal muscle regeneration. *The American journal of pathology*, 161(3), pp.1023–31.
- Kääriäinen, M. et al., 2001. Regulation of alpha7 integrin by mechanical stress during skeletal muscle regeneration. *Neuromuscular disorders : NMD*, 11(4), pp.360–9.
- Kääriäinen, M. et al., 2000. Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 10(6), pp.332–7.
- Kaasik, P., Riso, E.-M. & Seene, T., 2011. Extracellular matrix and myofibrils during unloading and reloading of skeletal muscle. *International journal of sports medicine*, 32(4), pp.247–53.
- Kadi, F. et al., 2005. The behaviour of satellite cells in response to exercise: what have we learned from human studies? *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 451(2), pp.319–27.
- Kadi, F. et al., 2004. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *The Journal of physiology*, 558(Pt 3), pp.1005–12.
- Kami, K. & Senba, E., 2002. In vivo activation of STAT3 signaling in satellite cells and myofibers in regenerating rat skeletal muscles. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 50(12), pp.1579–89.
- Kang, C. et al., 2009. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha signaling is redox sensitive. *Free radical biology & medicine*, 47(10), pp.1394–400.
- Kannus, P. et al., 2003. Basic science and clinical studies coincide: active treatment approach is needed after a sports injury. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 13(3), pp.150–4.
- Karnes, J.L. & Burton, H.W., 2002. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Archives of*

physical medicine and rehabilitation, 83(1), pp.1–4.

- Kasemkijwattana, C. et al., 2000. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clinical orthopaedics and related research*, (370), pp.272–85.
- Kassar-Duchossoy, L. et al., 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, 431(7007), pp.466–71.
- Kästner, S. et al., 2000. Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 48(8), pp.1079–96.
- Kelc, R. et al., 2015. Platelet-Rich Plasma, Especially When Combined with a TGF- β Inhibitor Promotes Proliferation, Viability and Myogenic Differentiation of Myoblasts In Vitro M. J. Goumans, ed. *PLOS ONE*, 10(2), p.e0117302.
- Kharraz, Y. et al., 2013. Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators of inflammation*, 2013, p.491497.
- Khattak, M.J. et al., 2010. Muscle healing and nerve regeneration in a muscle contusion model in the rat. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 92(6), pp.894–9.
- Kon, E. et al., 2011. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 19(4), pp.516–527.
- Koulouris, G. et al., 2007. Magnetic resonance imaging parameters for assessing risk of recurrent hamstring injuries in elite athletes. *The American journal of sports medicine*, 35(9), pp.1500–6.
- Koulouris, G. & Connell, D., 2005. Hamstring Muscle Complex: An Imaging Review. *RadioGraphics*, 25(3), pp.571–586.
- Kujala, U.M., Orava, S. & Järvinen, M., 1997. Hamstring injuries. Current trends in treatment and prevention. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 23(6), pp.397–404.
- Kurek, J.B. et al., 1996. Leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are produced by diseased and regenerating skeletal muscle. *Muscle & nerve*, 19(10), pp.1291–301.
- Kurek, J.B. et al., 1997. The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle & nerve*, 20(7), pp.815–22.
- Kurosaka, M. et al., 2009. Effects of voluntary wheel running on satellite cells in the rat plantaris muscle. *Journal of sports science & medicine*, 8(1), pp.51–7.
- Kushida, S. et al., 2013. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. *Annals of plastic*

- surgery*, 71(2), pp.219–24.
- Kvist, M. et al., 1995. Vascular density at the myotendinous junction of the rat gastrocnemius muscle after immobilization and remobilization. *The American journal of sports medicine*, 23(3), pp.359–64.
- Laumonier, T. & Menetrey, J., 2016. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of experimental orthopaedics*, 3(1), p.15.
- Laye, M.J. et al., 2015. Physical activity enhances metabolic fitness independently of cardiorespiratory fitness in marathon runners. *Disease markers*, 2015, p.806418.
- Lech, M. & Anders, H.-J., 2013. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(7), pp.989–97.
- Lee, K.S. et al., 2011. Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? *AJR. American journal of roentgenology*, 196(3), pp.628–36.
- Lee, Y.S. et al., 2011. Serial MR imaging of intramuscular hematoma: experimental study in a rat model with the pathologic correlation. *Korean journal of radiology*, 12(1), pp.66–77.
- Lefaucheur, J.P. & Sébille, A., 1995a. Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin-like growth factor I. *Journal of neuroimmunology*, 57(1–2), pp.85–91.
- Lefaucheur, J.P. & Sébille, A., 1995b. The cellular events of injured muscle regeneration depend on the nature of the injury. *Neuromuscular disorders : NMD*, 5(6), pp.501–9.
- Lefevre, B. et al., 1996. Innervation regulates myosin heavy chain isoform expression in developing skeletal muscle fibers. *Mechanisms of development*, 58(1–2), pp.115–27.
- Lehto, M., Duance, V.C. & Restall, D., 1985. Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 67(5), pp.820–8.
- Lehto, M., Sims, T.J. & Bailey, A.J., 1985. Skeletal muscle injury--molecular changes in the collagen during healing. *Research in experimental medicine. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*, 185(2), pp.95–106.
- Lei, H., Gui, L. & Xiao, R., 2009. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clinical biochemistry*, 42(13–14), pp.1452–60.
- Levine, W.N. et al., 2000. Intramuscular corticosteroid injection for hamstring

- injuries. A 13-year experience in the National Football League. *The American journal of sports medicine*, 28(3), pp.297–300.
- Levinovitz, A. et al., 1992. Activation of insulin-like growth factor II expression during skeletal muscle regeneration in the rat: correlation with myotube formation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(8), pp.1227–34.
- Lexell, J., Taylor, C.C. & Sjöström, M., 1988. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *Journal of the neurological sciences*, 84(2–3), pp.275–94.
- Li, H. et al., 2016. Customized platelet-rich plasma with transforming growth factor β 1 neutralization antibody to reduce fibrosis in skeletal muscle. *Biomaterials*, 87, pp.147–56.
- Light, N. & Champion, A.E., 1984. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *The Biochemical journal*, 219(3), pp.1017–26.
- Listrat, A. et al., 2000. Age-related changes and location of types I, III, XII and XIV collagen during development of skeletal muscles from genetically different animals. *The Histochemical journal*, 32(6), pp.349–56.
- Longo, U.G. et al., 2012. Tissue Engineered Strategies for Skeletal Muscle Injury. *Stem Cells International*, 2012, pp.1–9.
- Lu, P. et al., 2011. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), pp.a005058–a005058.
- Mackey, A.L. et al., 2014. Differential satellite cell density of type I and II fibres with lifelong endurance running in old men. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 210(3), pp.612–27.
- Maffei, M. et al., 2014. Actin sliding velocity on pure myosin isoforms from hindlimb unloaded mice. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 212(4), pp.316–29.
- Malliaropoulos, N. et al., 2010. Posterior Thigh Muscle Injuries in Elite Track and Field Athletes. *The American Journal of Sports Medicine*, 38(9), pp.1813–1819.
- Malliaropoulos, N. et al., 2010. Posterior thigh muscle injuries in elite track and field athletes. *The American journal of sports medicine*, 38(9), pp.1813–9.
- Malliaropoulos, N. et al., 2011. Reinjury after acute posterior thigh muscle injuries in elite track and field athletes. *The American journal of sports medicine*, 39(2), pp.304–10.
- Mann, C.J. et al., 2011. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal muscle*, 1(1), p.21.

- Markert, C.D. et al., 2005. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 86(7), pp.1304–10.
- Marotta, M. et al., 2007. Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscular disorders : NMD*, 17(9–10), pp.707–18.
- Marvulli, D., Volpin, D. & Bressan, G.M., 1996. Spatial and temporal changes of type VI collagen expression during mouse development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 206(4), pp.447–54.
- Marx, R.E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 62(4), pp.489–96.
- Marx, R.E., 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*, 10(4), pp.225–8.
- Mauch, F., Best, R. & Bauer, G., 2013. [Current treatment concepts for muscular injuries]. *Der Unfallchirurg*, 116(6), pp.488–96.
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9, pp.493–5.
- Mayer, U., 2003. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *The Journal of biological chemistry*, 278(17), pp.14587–90.
- Mazzucco, L. et al., 2009. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox sanguinis*, 97(2), pp.110–8.
- McCroskery, S. et al., 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology*, 162(6), pp.1135–47.
- McCullagh, K.J.A. et al., 2004. NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), pp.10590–5.
- McLennan, I.S., 1996. Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions. *Journal of anatomy*, pp.17–28.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M. & Lee, S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387(6628), pp.83–90.
- Menetrey, J. et al., 2000. Growth factors improve muscle healing in vivo. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 82(1), pp.131–7.

- Michele, D.E. & Campbell, K.P., 2003. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *The Journal of biological chemistry*, 278(18), pp.15457–60.
- Millar, A.P., 1979. Strains of the posterior calf musculature ("tennis leg"). *The American journal of sports medicine*, 7(3), pp.172–4.
- Miller, K.J. et al., 2000. Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *American journal of physiology. Cell physiology*, 278(1), pp.C174–81.
- Minamoto, V.B., Junho, S.R. & Salvini, T.F., 2001. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 34(11), pp.1447–52.
- Mishra, A., 2010. Platelet-rich plasma. *Orthopedics*, 33(7), pp.486–7.
- Mishra, A. et al., 2012. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(7), pp.1185–95.
- Mishra, D.K. et al., 1995. Anti-inflammatory medication after muscle injury. A treatment resulting in short-term improvement but subsequent loss of muscle function. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 77(10), pp.1510–9.
- Mitchell, C.A., McGeachie, J.K. & Grounds, M.D., 1992. Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell and tissue research*, 269(1), pp.159–66.
- Möller, M. et al., 2002. The ultrasonographic appearance of the ruptured Achilles tendon during healing: a longitudinal evaluation of surgical and nonsurgical treatment, with comparisons to MRI appearance. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 10(1), pp.49–56.
- Moraes, V.Y. et al., 2014. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. In V. Y. Moraes, ed. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. CD010071.
- Morici, G. et al., 2005. Supramaximal exercise mobilizes hematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 289(5), pp.R1496–503.
- Mueller-Wohlfahrt, H.-W. et al., 2013. Terminology and classification of muscle injuries in sport: the Munich consensus statement. *British journal of sports medicine*, 47(6), pp.342–50.
- Myers, J.C. et al., 1996. Type XV collagen exhibits a widespread distribution in human tissues but a distinct localization in basement membrane zones. *Cell and tissue research*, 286(3), pp.493–505.
- Negishi, S. et al., 2005. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle injuries. *The American journal of sports medicine*, 33(12), pp.1816–24.

- Nishimura, T. et al., 1997. Developmental expression of extracellular matrix components in intramuscular connective tissue of bovine semitendinosus muscle. *Histochemistry and cell biology*, 107(3), pp.215–21.
- Noonan, T.J. & Garrett, W.E., 1999. Muscle strain injury: diagnosis and treatment. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 7(4), pp.262–9.
- O'Donoghue, D.H., 2002. Introduction. Treatment of injuries to athletes. 1962. *Clinical orthopaedics and related research*, (402), pp.3–8.
- O'Kane, S. & Ferguson, M.W., 1997. Transforming growth factor beta s and wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(1), pp.63–78.
- Obremsky, W.T. et al., 1994. Biomechanical and histologic assessment of a controlled muscle strain injury treated with piroxicam. *The American journal of sports medicine*, 22(4), pp.558–61.
- Ogilvie, R.W. et al., 1988. Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise. *The American journal of anatomy*, 182(4), pp.335–46.
- Olwin, B.B. & Rapraeger, A., 1992. Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. *The Journal of cell biology*, 118(3), pp.631–9.
- Orchard, J., Best, T.M. & Verrall, G.M., 2005. Return to play following muscle strains. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*, 15(6), pp.436–41.
- Orchard, J.W., 2001. Intrinsic and extrinsic risk factors for muscle strains in Australian football. *The American journal of sports medicine*, 29(3), pp.300–3.
- Paoloni, J.A. et al., 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in sports medicine: guidelines for practical but sensible use. *British journal of sports medicine*, 43(11), pp.863–5.
- Parise, G., McKinnell, I.W. & Rudnicki, M.A., 2008. Muscle satellite cell and atypical myogenic progenitor response following exercise. *Muscle & nerve*, 37(5), pp.611–9.
- Park, G.-Y. & Kwon, D.R., 2014. Platelet-rich plasma limits the nerve injury caused by 10% dextrose in the rabbit median nerve. *Muscle & nerve*, 49(1), pp.56–60.
- Pas, H.I.M.F.L. et al., 2015. Efficacy of rehabilitation (lengthening) exercises, platelet-rich plasma injections, and other conservative interventions in acute hamstring injuries: an updated systematic review and meta-analysis. *British journal of sports medicine*, 49(18), pp.1197–205.
- Pavlath, G.K. et al., 1998. Heterogeneity among muscle precursor cells in adult skeletal muscles with differing regenerative capacities. *Developmental*

- dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 212(4), pp.495–508.
- Pedersen, B.K. & Febbraio, M.A., 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*, 88(4), pp.1379–406.
- Pereira, M.G., Silva, M.T., et al., 2014. Leucine supplementation accelerates connective tissue repair of injured tibialis anterior muscle. *Nutrients*, 6(10), pp.3981–4001.
- Pereira, M.G., Baptista, I.L., et al., 2014. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. A. Y. W. Chang, ed. *PloS one*, 9(1), p.e85283.
- Philippou, A. et al., 2007. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In vivo (Athens, Greece)*, 21(1), pp.45–54.
- Pisconti, A., Bernet, J.D. & Olwin, B.B., 2012. Syndecans in skeletal muscle development, regeneration and homeostasis. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 2(1), pp.1–9.
- Plant, D.R., Beitzel, F. & Lynch, G.S., 2005. Length-tension relationships are altered in regenerating muscles of the rat after bupivacaine injection. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(6), pp.1998–2003.
- Pollock, N. et al., 2014. British athletics muscle injury classification: a new grading system. *British journal of sports medicine*, 48(18), pp.1347–51.
- Pratt, S.J.P. et al., 2012. An in vivo rodent model of contraction-induced injury in the quadriceps muscle. *Injury*, 43(6), pp.788–93.
- Proske, U. & Allen, T.J., 2005. Damage to skeletal muscle from eccentric exercise. *Exercise and sport sciences reviews*, 33(2), pp.98–104.
- Proske, U. & Morgan, D.L., 2001. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. *The Journal of physiology*, 537(Pt 2), pp.333–45.
- Puntel, G.O. et al., 2013. Cryotherapy reduces skeletal muscle damage after ischemia/reperfusion in rats. *Journal of anatomy*, 222(2), pp.223–30.
- Puntel, G.O. et al., 2011. Therapeutic cold: An effective kind to modulate the oxidative damage resulting of a skeletal muscle contusion. *Free radical research*, 45(2), pp.125–38.
- Qaisar, R., Bhaskaran, S. & Van Remmen, H., 2016. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. *Free radical biology & medicine*, 98, pp.56–67.
- Quintero, A.J. et al., 2009. Stem Cells for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. *Clinics in Sports Medicine*, 28(1), pp.1–11.

- Raghow, R., 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(11), pp.823–31.
- Rahusen, F.T.G., Weinhold, P.S. & Almekinders, L.C., 2004. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acetaminophen in the treatment of an acute muscle injury. *The American journal of sports medicine*, 32(8), pp.1856–9.
- Ramos, L. et al., 2012. Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: effects on functional outcomes. *Photochemistry and photobiology*, 88(1), pp.154–60.
- Rantanen, J. et al., 1999. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. *The American journal of sports medicine*, 27(1), pp.54–9.
- Rapraeger, A.C., Krufka, A. & Olwin, B.B., 1991. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5013), pp.1705–8.
- Reider, B., 2016. Circumventing Biology. *The American journal of sports medicine*, 44(8), pp.1927–30.
- Relaix, F. et al., 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 435(7044), pp.948–53.
- Relaix, F. & Zammit, P.S., 2012. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development (Cambridge, England)*, 139(16), pp.2845–56.
- Reurink, G. et al., 2014. Myotoxicity of injections for acute muscle injuries: a systematic review. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 44(7), pp.943–56.
- Reurink, G. et al., 2015. 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*, 49(18), pp.1206–12.
- Reurink, G. & Goudswaard, 2014. Platelet-rich plasma injections in acute muscle injury. *The New England journal of medicine*, 370(26), pp.2546–7.
- Reynolds, J.F. et al., 1995. Non-steroidal anti-inflammatory drugs fail to enhance healing of acute hamstring injuries treated with physiotherapy. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 85(6), pp.517–22.
- Rhodes, S.J. & Konieczny, S.F., 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes & development*, 3(12B), pp.2050–61.
- Rodeo, S.A., 2016. Biologic Approaches in Sports Medicine: Potential, Perils, and Paths Forward. *The American journal of sports medicine*, 44(7), pp.1657–9.

- Rudnicki, M.A. et al., 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75(7), pp.1351–9.
- Saghizadeh, M. et al., 1996. The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 97(4), pp.1111–6.
- Salmons, S. & Sréter, F.A., 1976. Significance of impulse activity in the transformation of skeletal muscle type. *Nature*, 263(5572), pp.30–4.
- Sampson, S., Gerhardt, M. & Mandelbaum, B., 2008. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 1(3–4), pp.165–174.
- Sánchez, M. et al., 2009. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 39(5), pp.345–54.
- Sánchez, M. et al., 2014. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of common peroneal nerve palsy associated with multiple ligament injuries of the knee. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 22(5), pp.1084–9.
- Sariguney, Y. et al., 2008. Effect of Platelet-Rich Plasma on Peripheral Nerve Regeneration. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 24(3), pp.159–167.
- Sartore, S., Gorza, L. & Schiaffino, S., 1982. Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. *Nature*, 298(5871), pp.294–6.
- Schaefer, L. & Schaefer, R.M., 2010. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and tissue research*, 339(1), pp.237–46.
- Schaser, K.-D. et al., 2007. Prolonged superficial local cryotherapy attenuates microcirculatory impairment, regional inflammation, and muscle necrosis after closed soft tissue injury in rats. *The American journal of sports medicine*, 35(1), pp.93–102.
- Schiaffino, S., 2010. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 199(4), pp.451–63.
- Schippinger, G. et al., 2012. Does single intramuscular application of autologous conditioned plasma influence systemic circulating growth factors? *Journal of sports science & medicine*, 11(3), pp.551–6.
- Schippinger, G. et al., 2011. Influence of Intramuscular Application of Autologous Conditioned Plasma on Systemic Circulating IGF-1. *Journal of sports science & medicine*, 10(3), pp.439–44.
- Schmalbruch, H., 1976. The morphology of regeneration of skeletal muscles in the rat. *Tissue & cell*, 8(4), pp.673–92.
- Schmalbruch, H. & Lewis, D.M., 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle & nerve*,

- 23(4), pp.617–26.
- Scholz, D. et al., 2003. Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Molecular and cellular biochemistry*, 246(1–2), pp.57–67.
- Schultz, E. & McCormick, K.M., 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 123, pp.213–57.
- Scribbans, T.D. et al., 2014. Fibre-specific responses to endurance and low volume high intensity interval training: striking similarities in acute and chronic adaptation. S. E. Alway, ed. *PloS one*, 9(6), p.e98119.
- Semenza, G.L., 2016. Targeting hypoxia-inducible factor 1 to stimulate tissue vascularization. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 64(2), pp.361–3.
- Serrano, A.L. et al., 2008. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell metabolism*, 7(1), pp.33–44.
- Shanks, P. et al., 2010. The effectiveness of therapeutic ultrasound for musculoskeletal conditions of the lower limb: A literature review. *The Foot*, 20(4), pp.133–139.
- Shen, W. et al., 2008. Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury. *Journal of cellular physiology*, 214(2), pp.405–12.
- Sherry, M.A., Johnston, T.S. & Heiderscheit, B.C., 2015. Rehabilitation of Acute Hamstring Strain Injuries. *Clinics in Sports Medicine*, 34(2), pp.263–284.
- Silveira, P.C.L. et al., 2010. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound in medicine & biology*, 36(1), pp.44–50.
- Smerdu, V. et al., 1994. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *The American journal of physiology*, 267(6 Pt 1), pp.C1723–8.
- De Smet, A.A. et al., 1990. Magnetic resonance imaging of muscle tears. *Skeletal radiology*, 19(4), pp.283–6.
- De Smet, A.A. & Best, T.M., 2000. MR imaging of the distribution and location of acute hamstring injuries in athletes. *AJR. American journal of roentgenology*, 174(2), pp.393–9.
- Snow, M.H., 1978. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell and tissue research*, 186(3), pp.535–40.
- Song, H. et al., 2012. Characteristics of myogenic response and ankle torque recovery after lengthening contraction-induced rat gastrocnemius injury. *BMC*

musculoskeletal disorders, 13, p.211.

- Song, H., Nakazato, K. & Nakajima, H., 2004. Effect of increased excursion of the ankle on the severity of acute eccentric contraction-induced strain injury in the gastrocnemius: an in vivo rat study. *The American journal of sports medicine*, 32(5), pp.1263–9.
- du Souich, P., 2014. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(3), pp.362–374.
- Stanco, D. et al., 2012. Applications and limits of platelet-rich plasma in sports related injuries. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 26(2 Suppl 1), p.53S–61S.
- Stanton, P. & Purdham, C., 1989. Hamstring injuries in sprinting - the role of eccentric exercise. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, 10(9), pp.343–9.
- St Pierre Schneider, B. et al., 2002. CD11b+ neutrophils predominate over RAM11+ macrophages in stretch-injured muscle. *Muscle & nerve*, 25(6), pp.837–44.
- Stauber, W.T., 2004. Factors involved in strain-induced injury in skeletal muscles and outcomes of prolonged exposures. *Journal of electromyography and kinesiology: official journal of the International Society of Electrophysiological Kinesiology*, 14(1), pp.61–70.
- Stauber, W.T. & Willems, M.E.T., 2002. Prevention of histopathologic changes from 30 repeated stretches of active rat skeletal muscles by long inter-stretch rest times. *European journal of applied physiology*, 88(1–2), pp.94–9.
- Stevens, K.J. et al., 2010. Imaging and ultrasound-guided steroid injection of internal oblique muscle strains in baseball pitchers. *The American journal of sports medicine*, 38(3), pp.581–5.
- Strle, K. et al., 2007. Novel activity of an anti-inflammatory cytokine: IL-10 prevents TNF α -induced resistance to IGF-I in myoblasts. *Journal of neuroimmunology*, 188(1–2), pp.48–55.
- Sugiura T1, Kawaguchi Y, Soejima M, Katsumata Y, Gono T, Baba S, Kawamoto M, Murakawa Y, Yamanaka H, H.M., 2010. Increased HGF and c-Met in muscle tissues of polymyositis and dermatomyositis patients: beneficial roles of HGF in muscle regeneration. *Clin Immunol.*, 136(3), pp.387–99.
- Suhr, F. et al., 2007. Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 103(2), pp.474–83.
- Sunada, Y. & Campbell, K.P., 1995. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Current opinion in neurology*, 8(5), pp.379–84.

- Suryawan, A. et al., 2008. Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(4), pp.E868-75.
- Tajbakhsh, S. & Buckingham, M., 2000. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Current topics in developmental biology*, 48, pp.225-68.
- Takala, T.E. & Virtanen, P., 2000. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 10(6), pp.321-5.
- Takeda, H. et al., 2011. Prevention and management of knee osteoarthritis and knee cartilage injury in sports. *British journal of sports medicine*, 45(4), pp.304-9.
- Takeuchi, K. et al., 2014. Heat stress promotes skeletal muscle regeneration after crush injury in rats. *Acta histochemica*, 116(2), pp.327-34.
- Thorsson, O. et al., 1997. Immediate external compression in the management of an acute muscle injury. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 7(3), pp.182-90.
- Tidball, J.G., 1991. Force transmission across muscle cell membranes. *Journal of biomechanics*, 24 Suppl 1, pp.43-52.
- Tidball, J.G., 1995. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Medicine and science in sports and exercise*, 27(7), pp.1022-32.
- Tidball, J.G., 2005a. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R345-53.
- Tidball, J.G., 2005b. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R345-53.
- Tidball, J.G. & Daniel, T.L., 1986. Myotendinous junctions of tonic muscle cells: structure and loading. *Cell and tissue research*, 245(2), pp.315-22.
- Tidball, J.G. & Wehling-Henricks, M., 2007. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *The Journal of physiology*, 578(Pt 1), pp.327-36.
- Tiidus, P.M., 1998. Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 76(5), pp.533-8.
- Toumi, H. & Best, T.M., 2003. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *British journal of sports medicine*, 37(4), pp.284-6.
- Toumi, H., F'guyer, S. & Best, T.M., 2006. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *Journal of anatomy*, 208(4), pp.459-70.

- Trappe, S.W. et al., 1995. Skeletal muscle characteristics among distance runners: a 20-yr follow-up study. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 78(3), pp.823–9.
- Tremblay, P. & Gruss, P., 1994. Pax: genes for mice and men. *Pharmacology & therapeutics*, 61(1–2), pp.205–26.
- Vaittinen, S. et al., 2002. Transected myofibres may remain permanently divided in two parts. *Neuromuscular disorders : NMD*, 12(6), pp.584–7.
- Vergani, L. et al., 1998. Systemic administration of insulin-like growth factor decreases motor neuron cell death and promotes muscle reinnervation. *Journal of neuroscience research*, 54(6), pp.840–7..
- Volpi, P. et al., 2004. Muscle strains in soccer: a five-year survey of an Italian major league team. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 12(5), pp.482–5.
- Wackerhage, H., 2014. *Molecular Exercise Physiology. An introduction*. 1st ed. Routledge, ed.,
- Wagatsuma, A., 2007. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Molecular and cellular biochemistry*, 298(1–2), pp.151–9.
- Wangensteen, A. et al., 2015. MRI does not add value over and above patient history and clinical examination in predicting time to return to sport after acute hamstring injuries: a prospective cohort of 180 male athletes. *British Journal of Sports Medicine*, 49(24), pp.1579–1587.
- Ward, A.R., 2009. Electrical Stimulation Using Kilohertz-Frequency Alternating Current. *Physical Therapy*, 89(2), pp.181–190.
- Warren, G.L. et al., 2002. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(12), pp.1630–2.
- Warren, G.L., Lowe, D.A. & Armstrong, R.B., 1999. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 27(1), pp.43–59.
- Weibrich, G. et al., 2002. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 30(2), pp.97–102.
- Weishaupt, D., Schweitzer, M.E. & Morrison, W.B., 2001. Injuries to the distal gastrocnemius muscle: MR findings. *Journal of computer assisted tomography*, 25(5), pp.677–82.
- White, J. & Smythe, G., 2016. *Growth Factors and Cytokines in Skeletal Muscle Development, Growth, Regeneration and Disease. Advances in Experimental*

Medicine and Biology Springer.,

- White, J.P. et al., 2009. Overload-induced skeletal muscle extracellular matrix remodelling and myofibre growth in mice lacking IL-6. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 197(4), pp.321–32.
- Whitelock, J.M. et al., 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *The Journal of biological chemistry*, 271(17), pp.10079–86.
- Wilkin, L.D. et al., 2004. Influence of therapeutic ultrasound on skeletal muscle regeneration following blunt contusion. *International journal of sports medicine*, 25(1), pp.73–7.
- Willoughby, D.S., 2004. Effects of heavy resistance training on myostatin mRNA and protein expression. *Medicine and science in sports and exercise*, 36(4), pp.574–82.
- Wipff, P.-J. & Hinz, B., 2008. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *European journal of cell biology*, 87(8–9), pp.601–15.
- Woolf, A.D. & Pfleger, B., 2003. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(9), pp.646–56.
- Wright, W.E., Sassoon, D.A. & Lin, V.K., 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, 56(4), pp.607–17.
- Wrogemann, K. & Pena, S.D., 1976. Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet (London, England)*, 1(7961), pp.672–4.
- Wu, X. et al., 2012. A standardized rat model of volumetric muscle loss injury for the development of tissue engineering therapies. *BioResearch open access*, 1(6), pp.280–90.
- Wynn, T.A., 2004. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nature reviews. Immunology*, 4(8), pp.583–94.
- Xu, R., Boudreau, A. & Bissell, M.J., 2009. Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. *Cancer metastasis reviews*, 28(1–2), pp.167–76.
- Yablonka-Reuveni, Z., Seger, R. & Rivera, A.J., 1999. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 47(1), pp.23–42.
- Yan, Z. et al., 2003. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *The Journal of biological chemistry*, 278(10), pp.8826–36.

- Yang, S.Y. & Goldspink, G., 2002. Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS letters*, 522(1–3), pp.156–60.
- Zeng, C. et al., 2015. Effectiveness and safety of Glucosamine, chondroitin, the two in combination, or celecoxib in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Scientific Reports*, 5(1), p.16827.
- Zhang, L., 2010. Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins. In *Progress in molecular biology and translational science*. pp. 1–17.
- Zhu, J. et al., 2007. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *The Journal of biological chemistry*, 282(35), pp.25852–63.
- Ziltener, J.-L., Leal, S. & Fournier, P.-E., 2010. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: An update. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 53(4), pp.278–288.
- Zimmerman, G.A. & Weyrich, A.S., 2010. Immunology. Arsonists in rheumatoid arthritis. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5965), pp.528–9.