

Exploring the perfusion modifications occurring with massage in the human lower limbs by non-contact polarized spectroscopy

Explorando as modificações de perfusão que ocorrem com massagem nos membros humanos inferiores por espectroscopia polarizada sem contato

Clemente Rocha¹, Ana Macedo¹, Sérgio Nuno^{1,2}, Henrique Silva^{1,3}, Hugo Ferreira⁴, and L. Monteiro Rodrigues^{1,3}

¹Universidade Lusófona CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

²Clínica S João de Deus – CTD, Lisboa Portugal

³Universidade de Lisboa, Faculty of Pharmacy, Pharmacol. Sc Depart., Lisboa, Portugal

⁴Universidade de Lisboa, Faculty of Sciences – IBEB, Lisboa, Portugal

Email: monteiro.rodrigues@ulusofona.pt

Abstract

A circulatory adaptation affecting the circulation of both lower limbs seems to be part of a distal circulatory homeostatic mechanisms, in animals as in humans. This was also observed during massage with the contralateral limb responding similarly to the intervened limb. The present study is meant to explore this cooperation between limbs during massage, using a recently available non-contact polarized spectroscopy method. Six healthy volunteers (44.83 ± 12.64 years), both sexes, were submitted to two massage protocols applied in one random limb, using the other as control. Each protocol included three phases - I rest, II massage and III recovery. Laser Doppler Flowmetry (LDF) and Tissue Viability Imager (TiVi) signals were obtained from both limbs and analyzed ($p < 0.05$). Our results confirm previous observations where any intervention, massage included, affecting circulation in one of the lower limbs evokes a contralateral response in the non-intervened limb that seems to be part of the distal circulation regulation, affecting both limbs to maintain circulatory homeostasis.

Keywords: lower limb cooperation; microcirculation; massage; polarized spectroscopy; LDF

Resumo

Uma adaptação circulatória que afeta a circulação de ambos os membros inferiores parece fazer parte de mecanismos homeostáticos circulatórios distais, tanto em animais como em humanos. Isto também foi observado durante a massagem com o membro contralateral respondendo de forma semelhante ao membro intervencionado. O presente estudo tem como objetivo explorar essa cooperação entre membros durante a massagem, utilizando um método de espectroscopia polarizada sem contato recentemente disponível. Seis voluntários saudáveis ($44,83 \pm 12,64$ anos), de ambos os sexos, foram submetidos a dois protocolos de massagem aplicados aleatoriamente num membro, usando o outro como controlo. Cada protocolo incluiu três fases - I descanso, II massagem e III recuperação. Os sinais de fluxometria por laser Doppler (LDF) e “Tissue Viability Imager” (TiVi) foram obtidos de ambos os membros e analisados ($p < 0,05$). Os nossos resultados parecem confirmar observações prévias em que qualquer intervenção, incluindo massagem, que afete a circulação em um dos membros inferiores, evoca uma resposta contralateral no membro não intervencionado que parece fazer parte da regulação da circulação distal, que afeta ambos os membros para manter a homeostase circulatória.

Palavras-chave: cooperação membros inferiores; microcirculação; massagem; espectroscopia polarizada; FLD

Received /Recebido: 20/11/2018

Accepted / Aceite: 04/12/2018

Electronic Edition: www.alies.pt

Introduction

The complex nature of peripheral circulation regulation has been known for a long time and it is still an open issue^{1,2}. The final purpose is to ensure an adequate nutrition of all cells and organs by delivering nutrients, including gases, while removing waste for disposal by multiple mechanisms (diffusion, filtration) at the very cellular level. This demands a permanent balance between hemodynamics and the organ's perfusion pressure, which represents the balance between arterial blood pressure and its determinants, e.g., heart rate, stroke volume and total peripheral vascular resistance³. This also means that a highly structured network of vessels arranged to optimize oxygen delivery to the tissues is needed, having in mind that oxygen is also a local regulatory element of these functions, influencing resistance, but also controlled by other local and systemic (homeostatic) regulators⁴. Neural inputs as hormones signal the central nervous system which modulate regional autonomic nervous system outflows. The major integration centers, mechano- and metabo-receptors within skeletal muscle, cardiopulmonary and vascular baroreceptors, and chemoreceptors contribute to control of hemodynamics and sympathetic nerve activity and the interaction between afferent inputs in determining baroreflex control of autonomic output and vascular tone². These many influences explain the non-continuous character of blood perfusion, a direct result of the vasomotion, that is the movement of the vascular wall, resulting in periodic oscillations⁵ or flowmotion, which actually represent the influence of heartbeat, respiration, myogenic, neurogenic and endothelial activities^{6,10}. Many other factors might be implied in this regulation since the endothelium itself, recently compared to an "airport hub" where all functions are intrinsically interconnected, attracts more of our attention in particular related with its role in vascular disease and as a potential therapeutic target¹¹. Following some recent papers from our group¹² exploring new methodologies to assess in vivo microcirculatory physiology and pathophysiology, a potential cooperation between both limbs during the recovery period of an hindlimb procedure in the mouse⁴ was described. An identical phenomenon was referred some years ago in human patients as part of a long-term vascular adaptation to ischemia due to peripheral arterial occlusive disease¹³. More recently, we also detected that the postural vasoconstriction in the human foot obtained with the so-called venoarterial reflex (VAR) also significantly reduced the perfusion in the contralateral foot¹⁴. In both cases this cooperation seems to reveal other intervenients in the distal limb cir-

Introdução

A natureza complexa da regulação da circulação periférica é conhecida há muito tempo e ainda assim continua a ser um assunto em aberto^{1,2}. O objetivo final é garantir uma nutrição adequada de todas as células e órgãos, fornecendo nutrientes, incluindo gases, enquanto elimina os resíduos, através de múltiplos mecanismos (difusão, filtração) no próprio nível celular. Isso exige um equilíbrio permanente entre a hemodinâmica e a pressão de perfusão do órgão, que representa o equilíbrio entre a pressão arterial e seus determinantes, por exemplo, frequência cardíaca, volume sistólico e resistência vascular periférica total³. Isto também significa que é necessária uma rede altamente estruturada de vasos organizados para otimizar a entrega de oxigênio aos tecidos, tendo em mente que o oxigênio também é um elemento regulador local dessas funções, influenciando a resistência, mas também é controlado por outros reguladores locais e sistêmicos (homeostáticos)⁴. Os impulsos neuronais tal como as hormonas, sinalizam o sistema nervoso central que modula os fluxos regionais do sistema nervoso autônomo. Os principais centros de integração, mecanorreceptores e metaborreceptores do músculo esquelético, barorreceptores e quimiorreceptores cardiopulmonares e vasculares contribuem para o controlo da hemodinâmica e da atividade nervosa simpática, e a interação entre os impulsos aferentes na determinação do controlo barorreflexo do débito autonómico e do tônus vascular². Muitas influências explicam o caráter não contínuo da perfusão sanguínea, um resultado direto da vasomotricidade, que é o movimento da parede vascular, resultando em oscilações periódicas⁵ ou "flowmotion", que na verdade representam a influência do ritmo cardíaco, respiração e atividades miogénica, neurogénica e endoteliais^{6,10}. Muitos outros fatores podem estar implicados nesta regulação desde o próprio endotélio, comparado recentemente a um "hub" de aeroporto, onde todas as funções estão intrinsecamente interconectadas e atraem mais a nossa atenção, em particular as relacionadas com o seu papel na doença vascular e como um alvo terapêutico potencial¹¹. Na sequência de alguns artigos recentes do nosso grupo¹², que exploram novas metodologias para avaliação in vivo da fisiologia e fisiopatologia microcirculatórias, foi descrita uma cooperação potencial entre ambos os membros durante o período de recuperação de uma intervenção num membro traseiro de um rato⁴. Um fenómeno idêntico foi referido há alguns anos em pacientes humanos, como parte de uma adaptação vascular de longo termo a isquemia devido a doença arterial oclusiva periférica¹³. Mais recentemente, tam-

culatory homeostasis likely involving some cross-talk between local neurogenic and myogenic mechanisms central components via sympathetic efferents. Recently we found that massage in one inferior limb could induce a similar circulatory adaptation interfering with the circulatory homeostasis of both limbs¹⁵, confirming the same type of cooperation phenomena between limbs described previously. All these observations were obtained with non-invasive techniques, namely laser doppler flowmetry (LDF) and photoplethysmography (PPG), well known and experimented techniques, although not exempt from criticism and concerns^{4, 12, 16}. The present study is meant to explore this cooperation phenomena between limbs during massage using a recently available non-contact polarized spectroscopy method¹⁷⁻²⁰. No matter its preliminary character, the intention of the study is to better understand the full extent of the massage effects on the human inferior limb by eliminating the potential interference from contact measuring probes.

Materials and Methods

Six healthy volunteers, from both sexes (44.83 ± 12.64 years old, 3 females, 3 males), were selected from previously outlined inclusion and non-inclusion criteria after written informed consent. All procedures respected the Helsinki Declaration (and subsequent amendments) principles for human research²¹. An imposed prerequisite was the abstention from consumption of caffeine and alcoholic beverages for 24 hours, at least, prior to measurements. Volunteers were acclimatized for 20 minutes on the supine position before experiments, which took place in a controlled temperature and humidity room ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ and 40 to 60% respectively). The experimental design involved two protocols - I, an upward massage (upM) applied during 5 minutes on the ascending direction in one randomly selected leg and foot, from the middle of the foot until below the knee, and a second protocol, II, involving an identical procedure in a downward massage (dwM), that is, in the opposite direction. Both protocols involved three phases, Phase I, with perfusion recording in rest, in supine, for 5 minutes; Phase II with leg and foot massage for 5 minutes and, Phase III, recording for 5 minutes during

bém foi detetado que a vasoconstrição postural no pé humano obtida a partir do assim chamado reflexo venoarterial (RVA) também reduziu, significativamente, a perfusão no pé contralateral¹⁴. Em ambos os casos esta cooperação parece revelar outros intervenientes na homeostase circulatória na zona distal do membro, envolvendo provavelmente alguma comunicação entre os componentes centrais dos mecanismos neurogênicos e miogênicos locais, através de eferentes simpáticos. Recentemente, descobrimos que a massagem, efetuado num membro inferior, podia induzir uma adaptação circulatória similar, interferindo com a homeostase circulatória de ambos os membros¹⁵, confirmando o mesmo tipo de fenómeno de cooperação entre membros descrito acima. Todas estas observações foram obtidas com técnicas não invasivas, nomeadamente fluxometria por laser Doppler (FLD) e fotoplethysmografia (FPG), técnicas bem conhecidas e testadas, mas não isentas de críticas e preocupações^{4, 12, 16}. O presente estudo pretende explorar este fenómeno de cooperação entre os membros durante uma massagem, usando um método sem contacto de espectroscopia polarizada disponível recentemente¹⁷⁻²⁰. Não sendo importante o seu carácter preliminar, a intenção é entender melhor a verdadeira extensão dos efeitos da massagem no membro humano inferior, eliminando a potencial interferência do contacto das sondas de medição.

Materiais e Métodos

Seis voluntários saudáveis, de ambos os sexos ($44,83 \pm 12,64$ anos, 3 mulheres, 3 homens), foram selecionados a partir de critérios de inclusão e não inclusão previamente definidos, após consentimento informado por escrito. Todos os procedimentos respeitaram os princípios da Declaração de Helsínquia (e emendas subsequentes) para pesquisa em seres humanos²¹. Um pré-requisito imposto era a abstenção de cafeína e consumo de bebidas alcoólicas por 24 horas, pelo menos, antes das medições. Os voluntários foram aclimatados por 20 minutos em decúbito dorsal antes dos experimentos, que decorreram numa sala com temperatura e humidade controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ e 40 a 60%, respetivamente). O desenho experimental envolveu dois protocolos - I, uma massagem ascendente (upM) aplicada durante 5 minutos na direção ascendente em uma perna e pé selecionados aleatoriamente, do meio do pé até abaixo do joelho, e um segundo protocolo, II, envolvendo um procedimento idêntico em uma massagem descendente (dwM), que é na direção oposta. Ambos os protocolos envolveram três fases, Fase I, com registo de perfusão em repouso, em supina, por 5 minutos; Fase II, com

recovery (Figure 1). Both feet were kept in the same position during these three periods, with the contralateral limb serving as control. Both protocols were applied to all individuals, in a randomly order, separated by a 30 minute 'washout' period. Blood perfusion was measured in both inferior limbs by LDF (Perimed PF5010 system Perimed, Sweden) expressed in arbitrary Blood Perfusion Units (BPUs). LDF probes were applied in the inferior aspect of the second toe. We also used a non-contact polarized spectroscopy system the TiVi 700 (WheelsBridge AB, Sweden), to measure skin red blood cell concentration (RBCC), expressed in TiVi-index arbitrary units. This analysis focused on the dorsal area of both feet and legs (anterior area). Descriptive and non-parametric statistics were applied to both system's signals SPSS 21.0 (IBM, USA). Phase comparisons were carried out with the Wilcoxon signed-rank test for paired samples for each leg. A confidence level of 95% ($p < 0.05$) was adopted.

massagem na perna e no pé por 5 minutos e, Fase III, gravação por 5 minutos durante a recuperação (Figura 1). Ambos os pés foram mantidos na mesma posição durante esses três períodos, com o membro contralateral a servir como controle. Ambos os protocolos foram aplicados a todos os indivíduos, em ordem aleatória, separados por um período de 30 minutos de "washout". A perfusão sanguínea foi medida em ambos os membros inferiores por LDF (sistema Perimed PF5010 Perimed, Suécia) expresso em unidades arbitrárias de perfusão sanguínea (BPUs). Sondas de LDF foram aplicadas na zona inferior do segundo dedo do pé. Também foi utilizado um sistema de espectroscopia polarizada sem contato, o TiVi 700 (WheelsBridge AB, Suécia), para medir a concentração de glóbulos vermelhos (CGV) da pele, expressa em unidades arbitrárias de índice TiVi. Essa análise focou-se na zona dorsal dos dois pés e pernas (zona anterior). Estatística descritiva e não-paramétrica foram aplicadas aos dois sinais com o SPSS 21.0 (IBM, EUA). As comparações de fase foram realizadas com o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas para cada perna. Foi adotado um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

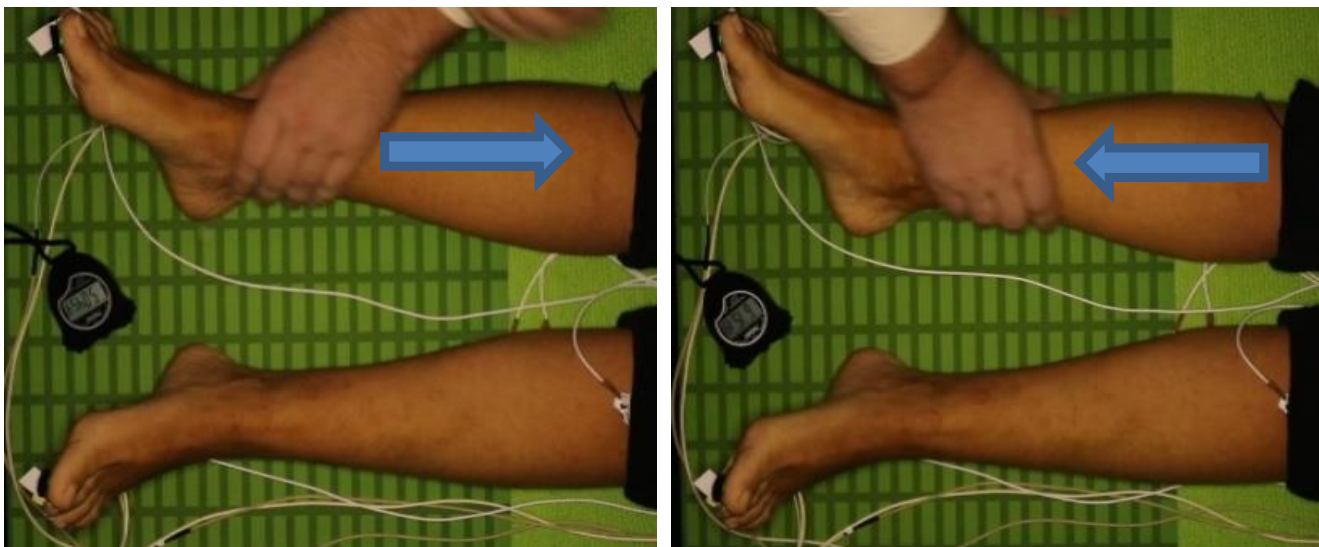


Figure 1 / Figura 1 - Massage protocols (upM on the left – dwM on the right)/ Protocolos de massagem (Ma à esquerda – Md à direita).

Results and Discussion

Table 1 resumes the main perfusion changes detected with both massage procedures in the present experimental conditions. Massage and its multiple variants, have been used also to improve peripheral microcirculation. However, no matter the evidence based results, only a few publications addressed this procedure from a physiological point of view^{22, 23} practically referring only to the relaxation effect obtained after massage and an apparent blood flow increase resulting from the pleasant relaxing sensations involved and interpreted as a consequence of a predominant parasympathetic activity. Our research has gone further by detecting changes during and after massage, demonstrating that there are much more interesting phenomena involved in these maneuvers. Recently, by comparing the response to massage in older and younger healthy individuals we saw that the same contralateral limb cooperation was present, also under these special circumstances where only one limb was being handled^{24, 25}. The response from the younger group was more obvious than the older group and the wavelet analysis of LDF and PPG signal components suggested that most differences were due to a lower myogenic and sympathetic response from the older groups. In any case, this contralateral foot perfusion response following a single limb massage is in line with our observations about this particular dynamics between human hind limbs pairs referred previously, likely intended to preserve the lower limb circulatory homeostasis^{24, 25}. As shown in Table 1 and illustrated in Figure 3, a significant increase in blood flow is detected by LDF in the test foot during Phase II of the ascending protocol. Both protocols elicit the expected increase in perfusion at the control limb, although without statistical significance. As discussed previously, this phenomena seems to be age – related, even in healthy volunteers²⁴. Polarised spectroscopy signals seems to be more stable than LDF recordings, showing much lower standard deviations, even during the massage (Table 1). We have now two regions of interest (ROI) for analysis in each leg, one in the foot and the other one in the leg as indicated (Figure 2). Contrary to what we observe with LDF (also reported with PPG), in the upward massage there is a decrease of perfusion here expressed as the RBCC in both ROI but only significant in the test foot. Interestingly, during Phase II of the upward massage, an increase in the RBCC contralateral limb is again present (Table 1, Figure 3) although not significant. For the downward massage manoeuvre, we could not identify a response pattern in the test areas, likely because these two ROI were too close to the intervention areas, being

Resultados e Discussão

A Tabela 1 resume as principais alterações de perfusão detetadas em ambos os procedimentos de massagem nas presentes condições experimentais. A massagem e as suas múltiplas variantes, têm sido usadas também para melhorar a microcirculação periférica. No entanto, apesar dos resultados baseados nas evidências, apenas algumas publicações abordaram este procedimento do ponto de vista fisiológico^{22, 23}, referindo praticamente apenas o efeito de relaxamento obtido após a massagem e a um aparente aumento do fluxo sanguíneo resultante das sensações agradáveis de relaxamento envolvidas e interpretadas como consequência de uma atividade parassimpática predominante. A nossa pesquisa foi mais longe, detetando alterações durante e depois da massagem, demonstrando que existem fenómenos muito mais interessantes envolvidos nestas manobras. Recentemente, quando comparada a resposta à massagem em indivíduos saudáveis mais velhos e mais jovens, vimos que a mesma cooperação contralateral dos membros estava presente, também sob essas circunstâncias especiais, onde apenas um membro estava sendo manipulado^{24, 25}. A resposta do grupo mais jovem foi mais pronunciada que a resposta do grupo mais velho e a análise wavelet dos componentes dos sinais do FLD e da FPG sugeriu que as principais diferenças se deviam a uma resposta miogénica e simpática mais baixas no caso do grupo dos mais velhos. Em qualquer dos casos, esta resposta da perfusão no pé contralateral, na sequência de massagem apenas de um membro está em linha com as nossas observações sobre esta dinâmica específica entre o par de membros inferiores humanos, referida anteriormente, provavelmente destinada a preservar a homeostase circulatória dos membros inferiores^{24, 25}. Conforme apresentado na Tabela 1 e ilustrado na Figura 3, é detetado pelo FLD um aumento significativo no fluxo sanguíneo no pé teste durante a Fase II do protocolo ascendente. Os dois protocolos apresentaram o aumento esperado da perfusão no membro controlo, embora sem significância estatística. Conforme discutido previamente, este fenómeno parece estar relacionado com a idade, mesmo em voluntários saudáveis²⁴. Os sinais de espectroscopia polarizada parecem ser mais estáveis, mostrando desvios padrão muito menores, mesmo durante a massagem, em comparação com os registos de FLD (Tabela 1). Temos assim duas regiões de interesse (RI) para análise, em cada perna, uma no pé e outra na perna como indicado (Figura 2). Contrariamente ao que observamos com o FLD (também relatado com o FPG), na massagem ascendente há uma diminuição da perfusão aqui expressa como CGV em

affected by the handling compression. Nevertheless, a consistent decrease of RBCC is again registered in the contralateral limb in both areas, although with no statistical significance.

ambos os RI, mas apenas significativa para o pé teste. Curiosamente, durante a Fase II da massagem ascendente, um aumento da CGV no membro contralateral está novamente presente (Tabela 1, Figura 3), embora não seja significativo. Para a manobra de massagem descendente não conseguimos identificar um padrão de resposta nas áreas de teste, provavelmente porque estas duas RI estavam muito próximos das áreas de intervenção, sendo afetados pela compressão de manuseio. Ainda assim, uma diminuição consistente de CGV é novamente registada no membro contralateral em ambas as áreas, apesar de não ser estatisticamente significativa.

Table 1/ Tabela 1 - Impact of the massage protocols (upward and downward) on the inferior limb perfusion changes measured by two non-invasive techniques. Mean values and respective standard deviations (sd) are shown as well as comparative statistics between phases (* p < 0.05; AU, arbitrary units) / Impacto de ambos os protocolos de massagem (ascendente e descendente) sobre as alterações de perfusão do membro inferior medidas por duas técnicas não invasivas. São mostrados os valores médios e os respectivos desvio padrão, bem como a comparação entre fases (* p < 0,05; UA unidades arbitrárias)

	LDF (AU/UA)		TiVi (AU /UA)			
	test foot/pé teste	foot/pé control	test foot/pé teste	foot/pé control	test leg/perna teste	leg/perna control
Upward /Ascendente						
Phase I/Fase I	25.69 ± 31.51	15.69 ± 17.82	179.08 ± 33.64	172.82 ± 25.60	190.14 ± 26.17	186.68 ± 28.83
Phase II/Fase II	35.383 ± 3.72	16.80 ± 20.19	167.21 ± 33.37	173.51 ± 24.14	177.45 ± 32.70	189.59 ± 35.89
Phase III/Fase III	25.69 ± 35.10	14.05 ± 15.70	173.96 ± 26.53	168.01 ± 25.20	183.28 ± 37.51	186.73 ± 40.02
ΔII-I (%)	37.732 p=0.028*	7.107 p=0.345	-6.627 p=0.028*	0.398 p=0.345	-6.673 p=0.249	1.561 p=0.917
ΔIII-I (%)	-0.006 p=0.753	-10.454 p=0.345	-2.862 p=0.753	-2.785 p=0.463	-3.610 p=0.249	0.029 p=0.463
Downward /Descendente						
Phase I/Fase I	18.53 ± 20.02	11.97 ± 12.46	175.38 ± 36.74	180.07 ± 39.97	185.56 ± 26.93	174.60 ± 47.53
Phase II/Fase II	25.08 ± 23.21	12.29 ± 9.68	181.88 ± 35.13	179.84 ± 42.02	175.57 ± 18.01	173.92 ± 48.81
Phase III/Fase III	15.49 ± 13.92	9.46 ± 7.01	183.06 ± 41.37	179.86 ± 39.15	183.17 ± 23.22	179.37 ± 38.17
ΔII-I (%)	35.330 p=0.116	2.645 p=0.463	3.708 p=0.068	-0.125 p=0.715	-5.384 p=0.068	-0.387 p=0.715
ΔIII-I (%)	-16.397 p=0.463	-20.991 p=0.249	4.378 p=0.144	-0.117 p=1.000	-1.291 p=0.273	2.732 p=0.715

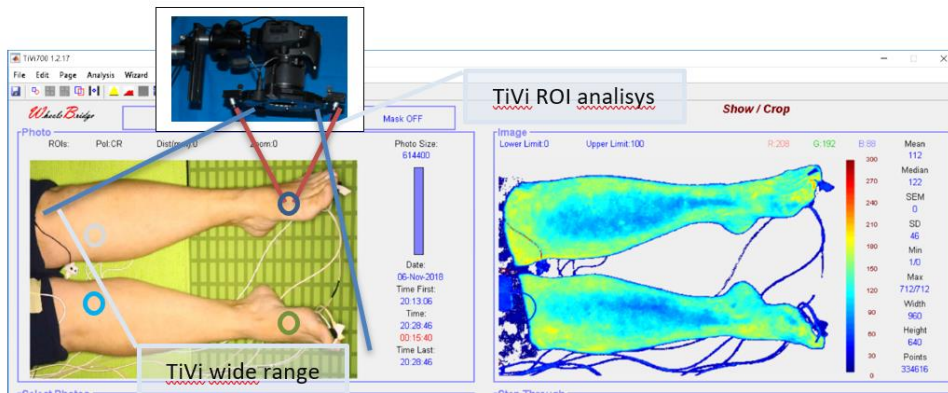


Figure 2/ Figura 2 - TiVi System (high definition image on the left – TiVi image on the right)/ Sistema TiVi (imagem de alta definição à esquerda – imagem TiVi à direita).

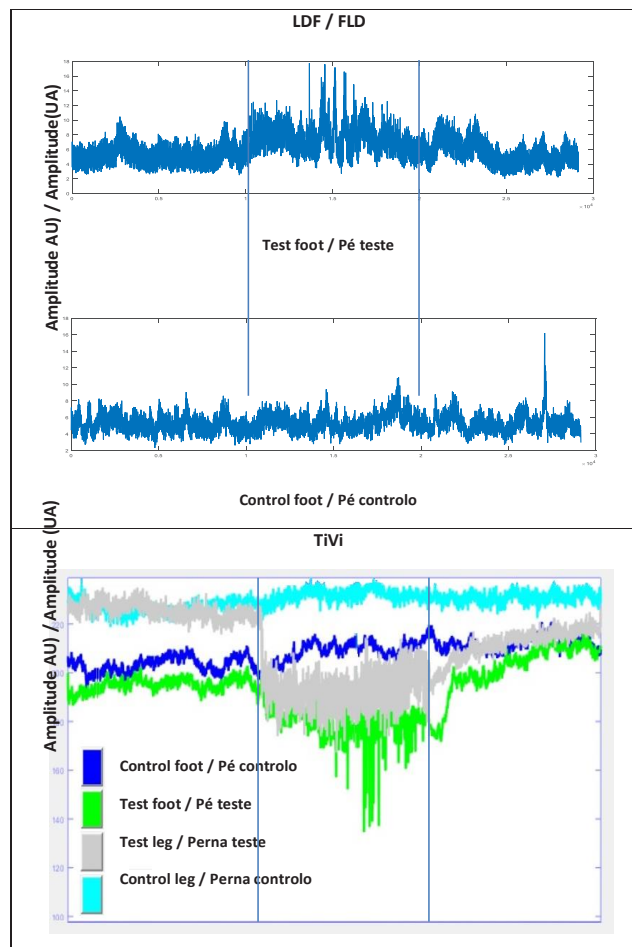


Figure 3/ Figura 3 - Illustrative example of LDF (up) and TiVi (bottom) signals obtained in the massaged limb (test foot) and in the contralateral non-massaged foot during the execution of one of the protocols (upM). Vertical lines indicate phase (I to III) transitions. As shown, after initiating Phase II in the massage limb, a contralateral response is always detected in the contralateral limb, regardless the applied technology (see text).
 Exemplo ilustrativo de sinais de FLD (em cima) e TiVi (em baixo) obtidos no membro massajado (teste) e no membro contralateral, não massajado, durante a execução de um dos protocolos (Ma). As linhas verticais indicam transições de fase (I a III). Conforme demonstrado, após iniciar a Fase II no membro massajado, uma resposta contralateral é consistentemente detetada ambas as tecnologias (ver texto).

Conclusion

This study seems to confirm that any intervention, massage included, in one of the lower limbs evokes a contralateral response in the non-intervened limb that seems to be part of the distal circulation regulation, affecting both limbs to maintain circulatory homeostasis. Moreover, this phenomenon seems to be affected by age, although the main regulator markers still need to be identified. Finally, although more experience is needed, the involvement of this new polarization spectroscopy instrument can help gather more information to better understand this phenomena.

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to all volunteers for their collaboration. This study was supported by FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, IP, project UID/DTP/04567/2016.

Conflict of Interests

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests.

Conclusão

Este estudo parece confirmar que qualquer intervenção, incluindo massagem, em um dos membros inferiores, evoca uma resposta contralateral no membro não intervencionado que parece fazer parte da regulação da circulação distal, afetando ambos os membros para manter a homeostase circulatória. Adicionalmente, este fenômeno parece ser afetado pela idade, embora os principais marcadores de regulação ainda precisem ser identificados. Finalmente, o envolvimento deste novo instrumento de espectroscopia de polarização, embora seja necessária mais experiência, pode ajudar a obter mais informação para melhor entender todos esses fenômenos.

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos a todos os voluntários pela sua colaboração. Este trabalho é financiado pela FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, IP, projeto UID/DTP/04567/2016.

Conflito de Interesses

Os autores declaram que não há relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

References/ Referências

1. Folkow B., Regulation of the peripheral circulation *British Heart Journal*, 1971, 33, Supplement, 27-31.
2. Ganong's Medical Physiology, A system's Approach Lange-McGrawHill Eds., 20th Ed, Boca Raton, USA, 2016
3. Raven PB, Chapleau MW Blood Pressure Regulation XI: Overview and Future Research Directions *Eur J Appl Physiol*. 2014 March; 114(3): 579–586. doi:10.1007/s00421-014-2823-z.
4. Rodrigues LM, Silva H, Ferreira H, Renault A, Gadeau AP. Observations on the perfusion recovery of regenerative angiogenesis in an ischemic limb model under hyperoxia. *Physiol Rep*, 2018,6 (11), e13736. doi: 10.14814/phy2.13736.
5. Aalkjær C, Boedtkjer D, Matchkov V. Vasomotion – what is currently thought? *Acta Physiologica*. 2011;202(3):253-69. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02320.x.
6. Bruning RS, Kenney WL, Alexander LM. Altered skin flowmotion in hypertensive humans. *Microvasc Res* 2015; 97:81-87. doi:10.1016/j.mvr.2014.01.001.
7. Bollinger A, Yanar A, Hoffmann U, Franzeck U (1993). "Is High-Frequency Flux Motion due to Respiration or to Vasomotion Activity?" in *Vasomotion and Flow Motion*. Karger Publishers, Basel.
8. Söderström T, Stefanovska A, Veber M, Svensson H. Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2003; 284(5):H1638-H46. doi: 10.1152/ajpheart.00826.2000.
9. Kvernmo HD, Stefanovska A, Kirkebøen KA, Kvernebo K. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators. *Microvascular Research* 1999; 57(3):298-309. doi: 10.1006/mvre.1998.2139.
10. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, Kirkebøen KA. Low frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvascular Research* 2006; 72(3):120-7. doi: 10.1016/j.mvr.2006.05.006.
11. Goligorsky M, Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F871–F880, 2005; doi:10.1152/ajprenal.00333.2004.
12. Silva H, Ferreira H, Bujan MJ, Rodrigues LM. Regarding the quantification of peripheral microcirculation-Comparing responses evoked in the in vivo human lower limb by postural changes, suprasystolic occlusion and oxygen breathing. *Microvasc Res*. 2015; 99:110-7.
13. Bongard, O., H. Bounameaux, and B. Fagrell. 1992. Effects of oxygen inhalation on skin microcirculation in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 86:878–886.
14. Silva H, Ferreira H, Silva HP, Rodrigues LM. The venoarterial reflex significantly reduces contralateral perfusion as part of the lower limb circulatory homeostasis in vivo. *Front. Physiol.* 9:1123, doi: 10.3389/fphys.2018.01123.
15. Rocha C, Silva H, Ferreira H, Rodrigues LM. Comparing the effects of human hind limb massage by analysis of Laser Doppler flowmetry and Photoplethysmography signal components using the wavelet transform. *Biomed Biopharm Res* 2018; (15)1:70-81. doi: 10.19277/bbr.15.1.176.
16. Rajan V, Varghese B, van Leeuwen TG, Steenbergen W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers Med Sci*. 2009; 24:269–283.
17. O'Doherty J, Henricson J, Anderson C, Leahy MJ, Nilsson GE, Sjöberg F. Sub-epidermal imaging using polarized light spectroscopy for assessment of skin microcirculation. *Skin Res Technol*. 2007 Nov;13(4):472-84.
18. Nilsson GE, Zhai H, Chan HP, Farahmand S, Maibach HI. Cutaneous bioengineering instrumentation standardization: the Tissue Viability Imager. *Skin Res Technol*. 2009 Feb;15(1):6-13.
19. O'Doherty J, McNamara P, Clancy NT, Enfield JG, Leahy MJ. Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J Biomed Opt*. 2009 May-Jun;14(3).
20. Allen J, Howell K. Microvascular Imaging techniques and opportunities. *Institute of Physics and Engineering in Medicine. Physiological Measurement*. 2014; 35; R91-R141.
21. World Medical Association, World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. 2013; *JAMA*310, 2191– 2194.
22. Goats, GC, Massage – the scientific basis of an ancient art: part 2. Physiological and therapeutic effects. *Br J Sports Med*, 1994, 28:153-156.
23. Gasibat Q, Suwehli W; Determining the Benefits of Massage Mechanisms: A Review of Literature. *Rehabilitation Sciences*. 2017; 3.: 58-67. doi: 10.11648/j.rs.20170203.12.
24. Rocha C, Silva H, Ferreira H, Rodrigues LM. Evidence of a Physiological Perfusion Balance Between Human Limb Pairs. *Europhysiology 2018 Abstract Book*. Available at: <https://www.europhysiology2018.org/sites/default/files/files/Europhysiology%202018_ABSTRACTS_ONLINE.pdf>
25. Rocha C, Silva H, Ferreira H, Macedo A Rodrigues LM. Does ageing influences the hindlimb response to massage in human? III CBIOS Seminar Abstract Book, *Biomed Biopharm Res*. 2018. 15 (2) in press.