

## Comparing the effects of human hind limb massage by analysis of Laser Doppler Flowmetry and Photoplethysmography signal components using the wavelet transform

*Comparando os efeitos da massagem no membro inferior humano através da análise dos componentes dos sinais de Fluxometria de Laser Doppler e de Fotopletismografia utilizando a transformada de wavelet*

**Clemente Rocha<sup>1</sup>, Henrique Silva<sup>1,2</sup>, Hugo Ferreira<sup>3</sup> and L. Monteiro Rodrigues<sup>1,2</sup>**

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

<sup>2</sup> Universidade de Lisboa, Faculty of Pharmacy, Pharmacol. Sc Depart - Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Universidade de Lisboa, Faculty of Sciences - Institute of Biophysics and Biomedical Engineering  
Email: c.rocha.dr@gmail.com

---

### Abstract

Non-invasive optical techniques, such as LDF (laser Doppler flowmetry) and PPG (photoplethysmography) are leading technologies to assess the human microcirculation. New mathematical strategies for signal processing such as WT (wavelet transform) have been developed to enhance its quantification capabilities. We have dedicated some effort to better understand the impact of massage therapy, a non-conventional technique used to relieve symptoms of vascular failure and improve functions, using these instruments. A group of 24 young healthy volunteers ( $19.9 \pm 1.7$  years old), both sexes, was submitted to two massage protocols applied in one limb, the other serving as control. Each protocol included three phases - rest (I), massage (II), and recovery (III). LDF and PPG signals were obtained from both limbs and analyzed with the WT ( $p < 0.05$ ).

A regional circulatory adaptation seems to take place during massage manoeuvres, affecting both test and control limbs detected with LDF and PPG. Some differences are noted regarding their oscillatory components, being clear that both sympathetic and myogenic components play a central role in the process. It is also clear that the simultaneous use of these two technologies seems to provide more detail and sensitivity in the analysis of the phenomena involved.

**Keywords:** hind limb massage; LDF; PPG; wavelet transform; microcirculation.

---

### Resumo

Técnicas óticas não invasivas, como o FLD (fluxometria por laser Doppler) e a FPG (fotopletismografia), vêm sendo utilizadas na avaliação da microcirculação em humanos. Novas estratégias matemáticas para processamento de sinais, como a TO (transformada de ondeleta), foram desenvolvidas para melhorar as suas capacidades de quantificação. Temos desenvolvido vários esforços para entender melhor o impacto da massagem, uma técnica não convencional usada para aliviar os sintomas de disfunção vascular, e melhorar a função, usando estes instrumentos. Um grupo de 24 jovens voluntários saudáveis ( $19.9 \pm 1.7$  anos), de ambos os sexos, foi submetido a dois protocolos de massagem aplicados em um dos membros, servindo o outro como controlo. Cada protocolo incluiu três fases – I descanso, II massagem e III recuperação. Foram obtidos sinais de LDF e PPG de ambos os membros e analisados com a TO ( $p < 0.05$ ).

Uma adaptação circulatória regional detetada com LDF e PPG ocorre durante as manobras de massagem, afetando ambos os membros. Algumas diferenças foram observadas em relação aos seus componentes oscilatórios, onde os componentes simpáticos e miogénicos parecem desempenhar um papel principal. Também está claro que o uso simultâneo dessas duas tecnologias parece fornecer uma análise mais sensível e apoiada dos fenômenos envolvidos.

**Palavras-chave:** massagem dos membros inferiores; LDF; PPG; transformada de ondeleta; microcirculação.

## Introduction

Several optical non-invasive techniques have been developed to access in vivo microcirculation, a main component of circulatory physiology<sup>1,2</sup>. LDF and PPG are among the most popular technologies, sharing the same optical principles, although with different operation requirements<sup>3-5</sup>. These have been extensively applied in human studies, with different purposes<sup>2,4,6</sup>. However, these technologies provide complex pulsatile signals, difficult to analyze, due to the contribution of different organs and systems<sup>4,7,8</sup>.

The need to obtain a deeper analysis of such types of biological signals motivated the development of other mathematical strategies for signal processing, from which the Morlet Wavelet Transform emerged<sup>9</sup>. This wavelet transform (WT) has been considered a suitable method for signal decomposition in relation to more classic approaches as the fast Fourier transform (FFT), which has a low resolution and thus reduced capabilities for low frequency analysis<sup>8,10</sup>. The WT provides a higher resolution and preserves the time/frequency relationship<sup>9</sup> which is essential when dealing with phenomena that vary in very low frequencies and over time, as in the case of most of the biological signals, such as perfusion pulses. This strategy has been thoroughly applied to LDF, allowing its spectral decomposition in its main components, thus oscillations with different time frequencies can be linked to the activity of different tissues or organs<sup>11,12</sup>. The human LDF components are identified as cardiac, respiratory, myogenic (vascular wall), sympathetic, endothelial NO-dependent activity and endothelial NO-independent, which typically correspond to spectral bands between 0.05 and 2 Hz<sup>13</sup>. More recently, this analysis was extended to PPG obtained with modern, more stable, systems, providing further analysis of these signals<sup>14,8</sup>.

The present study takes further our focus on the effects of massage over peripheral circulation in human<sup>7,15</sup>, to better characterize and understand this procedure, used in human health and also as a therapeutic tool. Although only a few studies have been published on this issue during the past decades, it is generally accepted that massage facilitates local blood perfusion while reducing heart rate and arterial blood pressure<sup>16,17</sup>. Pain relief and relaxation are recurrently referred, apparently associated to parasympathetic output<sup>15,17,18</sup>. Therefore, our goal was to look deeper into the LDF and PPG signals obtained during massage of the inferior limb of healthy volunteers, decomposed by WT, in order to compare their discriminative potential while having a

## Introdução

Várias técnicas óticas não invasivas foram desenvolvidas para avaliar a microcirculação in vivo, um componente principal da fisiologia circulatória<sup>1,2</sup>. A fluxometria por laser Doppler (FLD) e a fotopletismografia (FPG) estão entre as tecnologias mais populares, compartilhando os mesmos princípios biofísicos, embora com diferentes frequências e exigências de operação<sup>3,5</sup>. Estas tecnologias têm sido extensivamente usadas em humanos, com diferentes finalidades<sup>2,4,6</sup>, contudo, fornecem em ambos os casos, sinais pulsáteis complexos, difíceis de analisar, devido à influência de diferentes órgãos e sistemas sobre a sua aquisição e registo<sup>4,7,8</sup>.

A necessidade de se obter uma análise mais profunda de tais sinais biológicos, motivou o desenvolvimento de outras estratégias matemáticas para o processamento de sinais, a partir das quais a Transformada de Ondeta de Morlet emergiu<sup>9</sup>. Esta transformada de ondeta (TO) tem sido considerada um método adequado para decomposição de sinais em relação às abordagens mais clássicas, como a transformada rápida de Fourier (TRF), que possui baixa resolução, sendo menos capaz para a análise de baixa frequência<sup>8,10</sup>. Assim, a TO fornece uma resolução maior e preserva a relação tempo/frequência<sup>9</sup> que é essencial face a fenômenos que variam em frequências muito baixas e ao longo do tempo, como na maioria dos sinais biológicos, e como nos pulsos de perfusão. Essa estratégia foi amplamente aplicada à FLD, permitindo sua decomposição espectral nos seus principais componentes, o que significa que aquelas oscilações com diferentes frequências temporais poderiam, na verdade, estar relacionadas com a atividade de diferentes tecidos ou órgãos<sup>11,12</sup>. Os componentes da FLD humana são identificados com as seguintes origens - cardíaca, respiratória, miogénica (parede vascular), simpática, endotelial dependente de NO e endotelial independente de NO, que tipicamente correspondem a bandas espectrais entre 0,05 e 2Hz<sup>13</sup>. Mais recentemente, esta análise foi estendida ao PPG obtido com sistemas modernos e mais estáveis, permitindo uma análise mais aprofundada destes sinais<sup>14,8</sup>.

O presente estudo aprofunda o nosso foco nos efeitos da massagem sobre a circulação periférica em humanos<sup>7,15</sup>, para melhor caracterizar e compreender esse procedimento, também utilizado na saúde humana, até como instrumento terapêutico. Embora apenas alguns estudos tenham sido publicados sobre este tema nas últimas décadas, aceita-se que a massagem facilita a perfusão sanguínea local, enquanto reduz a frequência cardíaca e a pressão arterial<sup>16,17</sup>. O alívio da dor e o relaxamento são recorrentemente referidos, aparentemente associados à

new insight into the mechanisms involved in the physiological response.

## Materials and Methods

Twenty four young healthy volunteers, both sexes (19.9  $\pm$  1.7 years old, 13 females, 11 males), body mass index (BMI) 21.8 kg/m<sup>2</sup> and ankle-brachial index (ABI) 1.06, were selected from previously outlined inclusion and non-inclusion criteria<sup>20</sup> after written informed consent. All procedures respected the Helsinki Declaration (and subsequent amendments) principles for human research<sup>21</sup>.

Volunteers abstained from consuming caffeinated and alcoholic beverages 24 hours prior to experiments. Procedures took place in a room with controlled temperature (21  $\pm$  1°C) and humidity (40 to 60%). All volunteers were acclimatized for 20 minutes in the supine position prior to experiments.

Two protocols were carried out as follows - Protocol I, one session of an upward massage (upM) applied on the ascending direction in one randomly selected leg and foot, from the middle of the foot until below the knee, and Protocol II, also one session of a downward massage (dwM) in the opposite direction. Both protocols consisted of three phases, Phase I, recording during resting in supine, for 10 minutes; Phase II provocation with leg and foot massage for 5 minutes and, Phase III, recording during recovery for 10 minutes (Figure 1). The contralateral leg was used as control, keeping both feet in the same position during the experiments. Both protocols were performed in a randomly order and separated by a 30 minute 'washout' period. Blood flow was measured in the inferior aspect of the first and second toes in both feet, with PPG and LDF, respectively. LDF signal was obtained by a Perimed PF5010 system (Perimed, Sweden, expressed in arbitrary Blood Perfusion Units (BPUs) while PPG signal was obtained by a Bitalino Plugged Kit (PLUX Biosignals, Portugal), also expressed in BPUs, also allowing measurement of Blood Volume Pulse (BVP). The LDF system also recorded skin temperature in °C. LDF signal was recorded with a frequency of 32 Hz and the PPG signal was recorded at 100 Hz and then downsampled by a factor of 3 to 33.33 Hz. LDF and PPG signals were then decomposed in their main components (cardiac, respiratory, myogenic, sympathetic, endothelial NO-dependen-

ção parassimpática<sup>15, 17, 18</sup>. Portanto, o nosso objetivo é olhar mais profundamente para os sinais de FLD e FPG, obtidos durante a massagem do membro inferior de voluntários saudáveis, decompostos por TO, a fim de comparar o seu potencial discriminativo e procurar um novo olhar sobre os mecanismos envolvidos na resposta fisiológica implicada.

## Materiais e Métodos

Vinte e quatro jovens voluntários saudáveis, ambos sexos (19.9  $\pm$  1.7 anos, 13 mulheres, 11 homens), índice de massa corporal (IMC) 21.8 kg/m<sup>2</sup> e índice tornozelo-braquial (ITB) 1.06, foram selecionados a partir de critérios de inclusão e não inclusão previamente definidos<sup>20</sup> e após obtenção de consentimento informado. Todos os procedimentos respeitaram os princípios da Declaração de Helsínquia (e emendas subsequentes) para pesquisa em seres humanos<sup>21</sup>.

Os voluntários abstiveram-se de consumir bebidas cafeinadas e alcoólicas 24 horas antes dos experimentos. Os procedimentos foram realizados em sala com temperatura controlada (21  $\pm$  1°C) e humidade (40 a 60%). Todos os voluntários foram aclimatados durante 20 minutos na posição supina antes do início dos experimentos.

Foram aplicados dois protocolos - Protocolo I, consistindo numa sessão de massagem aplicada na direção ascendente (Ma) em uma perna e pé selecionados aleatoriamente, partindo do meio do pé até abaixo do joelho, e Protocolo II, consistindo numa sessão de uma massagem descendente (Md) na direção oposta. Ambos os protocolos incluíram em três fases, Fase I, registro em repouso em supinação, durante 10 minutos; Fase II de provocação com massagem de perna e pé durante 5 minutos e, Fase III, de recuperação com registro durante por 10 minutos (Figura 1). A perna contralateral foi usada como controlo, mantendo os dois pés na mesma posição durante as experiências. Ambos os protocolos foram realizados em ordem aleatória e separados por um período de 30 min de "washout". O fluxo sanguíneo foi medido na parte inferior do primeiro e segundo dedos em ambos os pés, com FPG e FLD, respetivamente. O sinal FLD foi obtido pelo sistema Perimed PF5010 (Perimed, Suécia, expresso em unidades arbitrárias de perfusão sanguínea (UP's), enquanto o sinal FPG foi obtido pela placa Bitalino Plugged Kit (PLUX Biosignals, Portugal), também expresso em UP's, permitindo também a medição do Volume de Pulso Sanguíneo (VPS). O sistema FLD também registrou a temperatura da pele em °C. O sinal FLD foi registrado com uma frequência de 32 Hz e o sinal FPG foi registrado em

dent (endoNOD) and endothelial NO-independent (endoNOI)) with WT and their contribution to the signals was assessed, based on the already detected<sup>23</sup> LDF frequency bands: (cardiac (0.6 Hz to 2 Hz), respiratory (0.145 Hz to 0.6 Hz), myogenic (0.052 Hz to 0.145 Hz), sympathetic (0.021 Hz to 0.052 Hz), endoNOD (0.0095 Hz to 0.021 Hz) and endoNOI (0.005 to 0.0095 Hz)). Descriptive and non-parametric statistics were applied to the signals and their WT components using SPSS 21.0 (IBM, USA). Phase comparisons were carried out with the Wilcoxon signed-rank test for paired samples for each leg, the Mann-Whitney U test for independent samples was used for leg comparisons, and the correlation between LDF and PPG signals was obtained with the Spearman test Rho coefficient ( $\rho$ ). A confidence level of 95% ( $p < 0.05$ ) was adopted for all tests.

100Hz e então diminuída a frequência por um fator de 3 a 33.33Hz. os sinais foram então decompostos em seus componentes principais (cardíaco, respiratório, miogénico, simpático, endotelial dependente de NO (endoNOD) e endotelial independente de NO (endoNOI)) com a TO e sua contribuição para os sinais foi avaliada, com base nas já detetadas<sup>23</sup> bandas de frequência FLD: (cardíaca (0.6 Hz a 2 Hz), respiratória (0.145 Hz a 0.6 Hz), miogénica (0.052 Hz a 0.145 Hz), simpática (0.021 Hz a 0.052 Hz), endoNOD (0.0095 Hz a 0.021 Hz) e endoNOI (0.005 a 0.0095 Hz)).

Estatística descritiva e não-paramétrica foram aplicadas aos sinais e seus componentes obtidos da TO, utilizando o programa SPSS 21.0 (IBM, EUA). As comparações de fase foram realizadas com o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas para cada perna, reservando o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes para comparações de perna. A correlação entre FLD e FPG foi obtida com o coeficiente Rho do teste de Spearman. Adotamos 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 (ascendente à esquerda – descendente à direita).

## Results

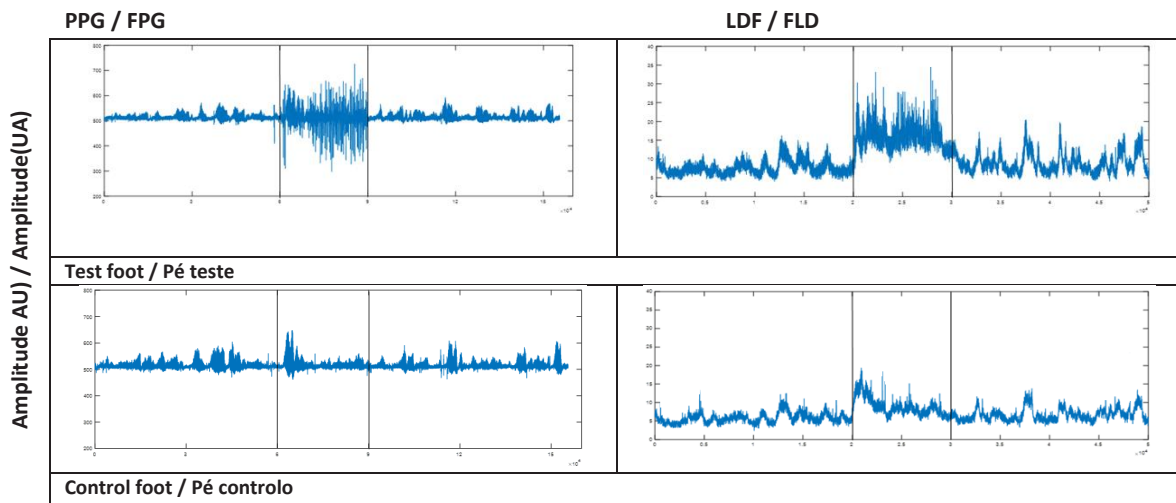
Correlating raw signals from both techniques (Table 1, Figure 2), shows for the upM protocol, a significant positive relation in all phases for both feet, in which Phase I was  $\rho = 0.711$  with  $p < 0.001$ , Phase II was  $\rho = 0.478$  with  $p = 0.018$ , and Phase III was  $\rho = 0.697$  with  $p < 0.001$  for the test foot. For the control foot, Phase I was  $\rho = 0.456$  with  $p = 0.025$ , Phase II was  $\rho = 0.484$  with  $p = 0.017$ , and in Phase III was  $\rho = 0.490$  with  $p = 0.015$ . For the dwM protocol, a similar result was found, meaning a significant positive correlation in all phases, except for Phase II in the test foot, where no significant correlation was found. Phase I was  $\rho = 0.659$  with  $p < 0.001$ , Phase II was  $\rho = 0.316$  with  $p = 0.133$ , and Phase III was  $\rho = 0.592$  with  $p = 0.002$  for the test foot. For the control foot, Phase I was  $\rho = 0.722$  with  $p < 0.001$ , Phase II was  $\rho = 0.684$  with  $p < 0.001$ , and Phase III was  $\rho = 0.693$  with  $p < 0.001$ .

## Resultados

Correlacionando os sinais brutos das duas técnicas (Tabela 1, Figura 2), encontramos para o protocolo de Ma, uma relação positiva e significativa em todas as fases para ambos os pés, na qual a fase I foi  $\rho = 0.711$  com  $p < 0.001$ , na fase II foi  $\rho = 0.478$  com  $p = 0.018$ , e na fase III foi  $\rho = 0.697$  com  $p < 0.001$  para o pé teste. Para o pé controlo, na fase I foi  $\rho = 0.456$  com  $p = 0.025$ , na fase II foi  $\rho = 0.484$  com  $p = 0.017$  e na fase III foi  $\rho = 0.490$  com  $p = 0.015$ . Para o protocolo de Md foi encontrado resultado semelhante, consistindo numa correlação positiva e significativa em todas as fases, excepto para a fase II no pé teste onde não foi encontrada correlação significativa, em que a fase I foi  $\rho = 0.659$  com  $p < 0.001$ , na fase II  $\rho = 0.316$  com  $p = 0.133$  e na fase III foi  $\rho = 0.592$  com  $p = 0.002$  para o pé teste. Para o pé controlo, na fase I foi  $\rho = 0.722$  com  $p < 0.001$ , na fase II foi  $\rho = 0.684$  com  $p < 0.001$  e na fase III foi  $\rho = 0.693$  com  $p < 0.001$ .

**Table 1/ Tabela 1** - Statistical comparison between LDF and PPG for each phase of massage protocols (dwM and upM). (see text) (\*p<0.05; \*\* p< 0.005).  
 Comparação estatística entre LDF e PPG para cada fase dos protocolos de massagem (dwM e upM (ver texto) (\* p <0,05; \*\* p <0,005).

	Phase I/Fase I	Phase II/Fase II	Phase III/Fase III
<b>upM Protocol</b>			
LDF v PPG test foot FLD v FPG pé teste	$\rho=0.711$ $p<0.001^{**}$	$\rho=0.478$ $p=0.018^*$	$\rho=0.697$ $p<0.001^{**}$
LDF v PPG control foot FPG v FPG pé controle	$\rho=0.456$ $p=0.025^*$	$\rho=0.484$ $p=0.017^*$	$\rho=0.490$ $p=0.015^*$
<b>dwM Protocol</b>			
LDF v PPG test foot FLD v FPG pé teste	$\rho=0.659$ $p<0.001^{**}$	$\rho=0.316$ $p=0.133$	$\rho=0.592$ $p=0.002^{**}$
LDF v PPG control foot FPG v FPG pé controle	$\rho=0.722$ $p<0.001^{**}$	$\rho=0.684$ $p<0.001^{**}$	$\rho=0.693$ $p<0.001^{**}$



**Figure 2/ Figura 2** - Illustrative example of PPG (left) and LDF (right) signals obtained in the massaged limb (test foot) and in the contralateral non-massaged foot during the execution of one of the protocols (dwM). Vertical lines indicate phase (I to III) transitions. As shown, after initiating Phase II in the massage limb, a contralateral response is detected in the resting limb, an event detected by both technologies (see text).

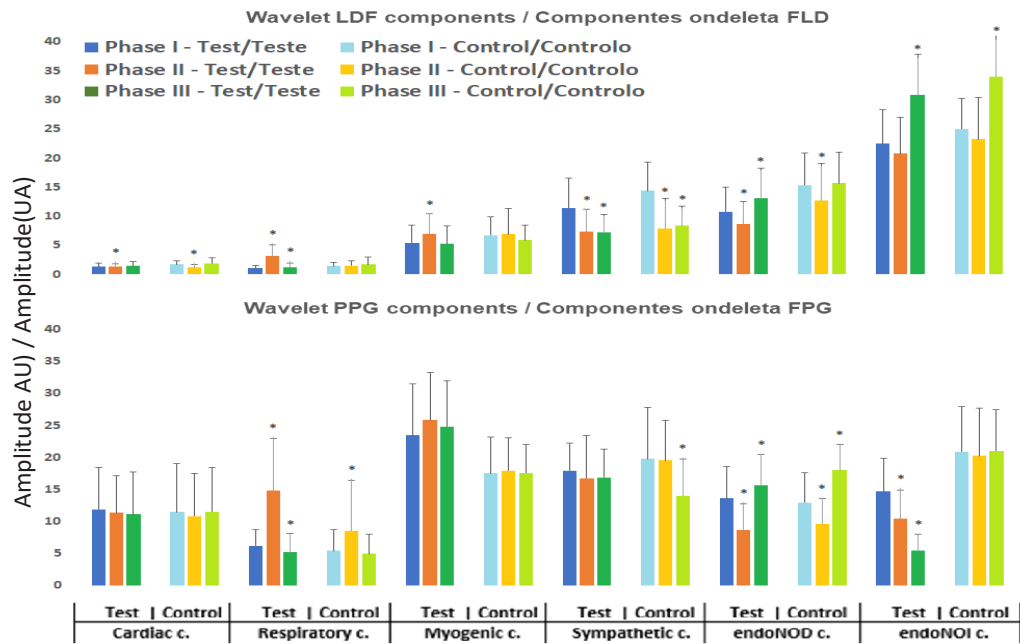
Exemplo ilustrativo de sinais de PPG (esquerda) e LDF (direita) obtidos no membro massageado (pé teste) e no pé não massageado (contralateral) durante a execução de um dos protocolos (dwM). As linhas verticais indicam transições de fase (I a III). Como se verifica, após o início da fase II, uma resposta contralateral é observada no membro em repouso, um evento detectado por ambas as tecnologias (ver texto).

The component analysis obtained from the application of the WT to both signals is graphically represented in Figures 3 and 4. For the upM we noticed a decrease in the cardiac components for LDF as for PPG components during Phase II, but only significant for LDF in the control foot ( $p < 0.001$ ) and in Phase III for test foot ( $p = 0.024$ ). A significant increase in the respiratory component was noted during Phase II ( $p < 0.001$  in both cases) for the test foot, and in PPG a significant increase was noted only in the control foot ( $p = 0.021$ ). Phase III also showed a significant increase in the respiratory component for both LDF and PPG ( $p = 0.022$  and  $p = 0.006$ , respectively) only in the test foot. An increase in the myogenic component during Phase II was noted in both feet, significant for LDF ( $p = 0.012$ ) in the test foot, which contributes to the increase of the blood perfusion. At the same time, a decrease in the sympathetic components during Phase II was noted in both feet, only significant in both feet for LDF ( $p < 0.001$ ). Still, for LDF a significant decrease in the sympathetic component was shown in Phase III for both test and control feet ( $p < 0.001$  in both feet), and in PPG a significant decrease only in the control foot ( $p < 0.001$ ). For the endoNOD component, during Phase II a significant decrease was noted in both test (LDF,  $p = 0.004$  and PPG,  $p < 0.001$ ) and control feet (LDF,  $p = 0.046$  and PPG,  $p = 0.001$ ). In Phase III, a significant increase in this component was noted for LDF ( $p = 0.016$ ) only in the test foot, and for PPG a significant increase for both feet ( $p = 0.037$  and  $p < 0.001$ ) was noted. Finally, for the endoNOI component, a decrease in Phase II was noted in LDF and PPG, but only significant ( $p < 0.001$ ) in the test foot for PPG. In Phase III, a recovery was shown with a significant increase for LDF in both feet ( $p < 0.001$  for both feet), and for PPG a significant decrease ( $p < 0.001$ ) for the test foot.

For the oscillatory components obtained with dwM WT (Figure 4), a non-significant decrease in the cardiac components for both LDF and PPG was shown in Phase II. An increase in the respiratory component during Phase II was also noted, but only significant ( $p < 0.001$  in both cases) for the test foot. In Phase III, a significant decrease in this component was shown by PPG in the test foot alone. An increase in the myogenic component was noted during Phase II for both technologies and in both feet, significant for LDF in both feet ( $p = 0.010$  and  $p = 0.003$ ). With LDF, in Phase III this component shows a significant increase, in the control foot ( $p = 0.002$ ), and for PPG a significant decrease in both feet ( $p = 0.011$  and  $p = 0.005$ ). During Phase II, sympathetic components showed a decrease for both technologies in both feet, only significant in the test foot ( $p = 0.034$  and  $p = 0.005$ ). Still in the sympathetic component PPG in

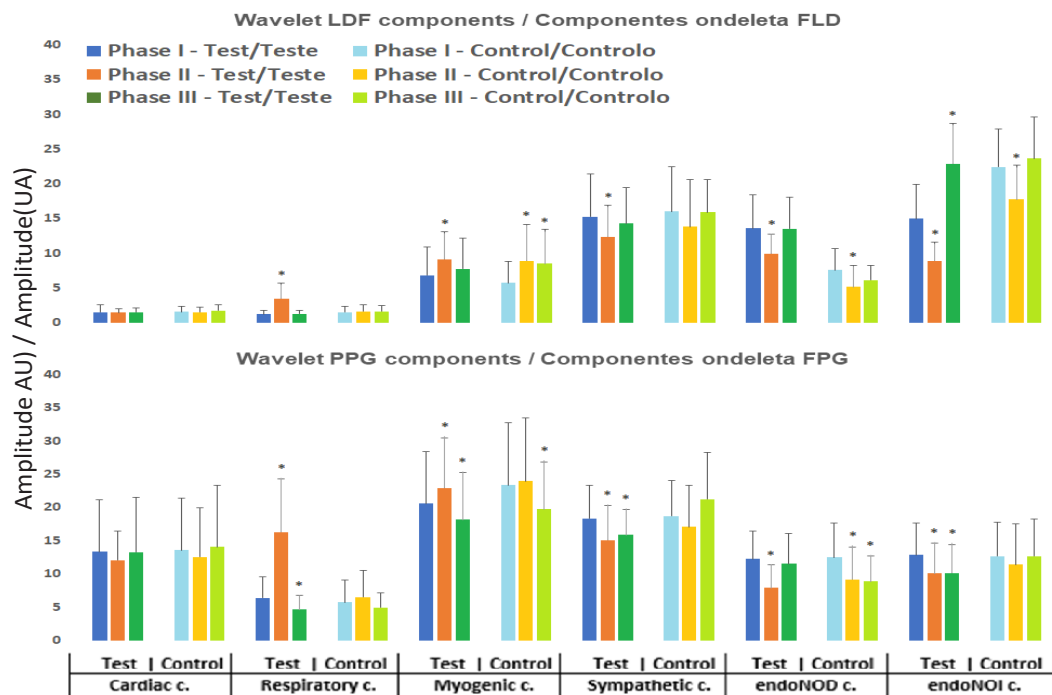
A análise de componentes obtida a partir da aplicação da TO para ambos os sinais está graficamente representada nas Figuras 3 e 4. Para a Ma verificamos, para ambas as componentes de FLD e de FPG, uma diminuição nas componentes cardíacas durante a fase II, mas apenas significativa para a FLD no pé controlo ( $p < 0.001$ ) e na fase III para o pé teste ( $p = 0.024$ ). É observado um aumento significativo na componente respiratória durante a fase II ( $p < 0.001$  em ambos os casos) para o pé teste, e na FPG um aumento significativo apenas no pé controlo ( $p = 0.021$ ). A fase III também mostra um aumento significativo na componente respiratória tanto para a FLD quanto para a FPG ( $p = 0.022$  e  $p = 0.006$ , respectivamente) apenas no pé teste. Um aumento da componente miogénica é observado durante a fase II em ambos os pés, significativo para a FLD ( $p = 0.012$ ) no pé teste, o que contribui para o aumento da perfusão sanguínea. Ao mesmo tempo, também durante a fase II, observa-se uma diminuição nas componentes simpáticas em ambos os pés, apenas significativa nos dois pés para a FLD ( $p < 0.001$ ). Ainda na componente simpática foi mostrada na fase III, para a FLD uma diminuição significativa tanto para o pé teste quanto para o controlo ( $p < 0.001$  nos dois pés) e na FPG uma diminuição significativa apenas no pé controlo ( $p < 0.001$ ). Para a componente endoNOD, durante a fase II observa-se uma diminuição significativa tanto no pé teste (FLD,  $p = 0.004$  e FPG,  $p < 0.001$ ) quanto no controlo (FLD,  $p = 0.046$  e FPG,  $p = 0.001$ ). Para esta componente, na fase III houve um aumento significativo para a FLD ( $p = 0.016$ ) apenas no pé teste e para a FPG houve um aumento significativo nos dois pés ( $p = 0.037$  e  $p < 0.001$ ). Finalmente, para a componente endoNOI, é observada uma diminuição na fase II na FLD e na FPG, mas apenas significativa ( $p < 0.001$ ) no pé de teste para a FPG. Na fase III, uma recuperação foi verificada, com um aumento significativo para a FLD nos dois pés ( $p < 0.001$  para ambos os pés) e para a FPG uma diminuição significativa ( $p < 0.001$ ) no pé teste.

Para os componentes oscilatórios obtidos com a TO da Md (Figura 4), a fase II mostra uma diminuição não significativa nos componentes cardíacas, tanto para a FLD quanto para a FPG. Também é observado um aumento na componente respiratória durante a fase II, mas apenas significativo ( $p < 0.001$  em ambos os casos) para o pé de teste. Para esta componente na fase III é apresentada, para a FPG, uma diminuição significativa apenas no pé teste. É observado um aumento na componente miogénica durante a fase II para ambas as tecnologias e em ambos os pés, significativo para a FLD em ambos os pés ( $p = 0.010$  e  $p = 0.003$ ). Esta componente mostra para a FLD na fase III um aumento significativo, no pé controlo ( $p = 0.002$ ), e para a FPG uma diminuição



**Figure 3/ Figura 3** - Component analysis of each phase of the upM protocol obtained by the Wavelet Transform of LDF and PPG signals (see text). Statistical comparison of the mean values of Phases II and III relative to Phase I is presented (\* $p < 0.05$ ).

Análise de componentes de cada fase do protocolo upM obtido pela Transformada Wavelet dos sinais LDF e PPG (ver texto). É ainda apresentada a comparação estatística dos valores médios das fases II e III em relação à fase I (\*  $p < 0,05$ ).



**Figure 4/ Figura 4** - Component analysis of each phase of the dwM protocol obtained by the Wavelet Transform of LDF and PPG signals (see text). Statistical comparison of the mean values of Phases II and III relative to Phase I is presented (\* $p < 0.05$ ).

Análise de componentes de cada fase do protocolo dwM obtido pela Transformada Wavelet dos sinais LDF e PPG (ver texto). É ainda apresentada a comparação estatística dos valores médios das fases II e III em relação à fase I (\*  $p < 0,05$ ).

Phase III showed a significant decrease for the test foot ( $p=0.032$ ). In Phase II, a significant decrease in the endoNOD component was noted by LDF and PPG in both test (LDF,  $p=0.002$  and PPG,  $p<0.001$ ) and control feet (LDF,  $p=0.003$  and PPG,  $p=0.015$ ). In Phase III for this component, a significant decrease for PPG ( $p=0.001$ ) was shown only in the control foot. Finally, for the endoNOI component, a decrease was shown in Phase II for both LDF and PPG, significant for LDF in both feet ( $p<0.001$  and  $p=0.001$ ), and for PPG in the test foot ( $p=0.007$ ). In Phase III a significant increase was shown for this component in the test foot ( $p<0.001$ ) for LDF while for PPG a significant decrease ( $p=0.004$ ) was shown for the same test foot.

The correlation analysis between LDF and PPG for both protocols are shown in Table 2. Regarding the upM protocol, a significant correlation for the cardiac component ( $p=0.014$ ) in the test foot and a non-significant correlation for the control foot was noted. A non-significant correlation for the respiratory component in the test foot and a significant correlation

significativa nos dois pés ( $p=0.011$  e  $p=0.005$ ). Durante a fase II, as componentes simpáticas mostram uma diminuição para ambas as tecnologias em ambos os pés, apenas significativa no pé teste ( $p=0.034$  e  $p=0.005$ ). Ainda na componente simpática, a FPG durante a fase III mostra uma diminuição significativa para o pé de teste ( $p=0.032$ ). Na componente endoNOD, durante a fase II, nota-se uma diminuição significativa da FLD e FPG em ambos os pés teste (FLD,  $p=0.002$  e FPG,  $p<0.001$ ) e controlo (FLD,  $p=0.003$  e FPG,  $p=0.015$ ). Na fase III para esta componente, é apresentada uma diminuição significativa para a FPG ( $p=0.001$ ), apenas no pé controlo. Finalmente, para a componente endoNOI, é apresentada uma diminuição na fase II, tanto para a FLD quanto para a FPG, apenas significativa para a FLD em ambos os pés ( $p<0.001$  e  $p=0.001$ ) e para FPG no pé teste ( $p=0.007$ ). Na fase III, um aumento significativo é mostrado para esta componente no pé de teste ( $p<0.001$ ) para a FLD, enquanto que para a FPG é mostrado um decréscimo significativo ( $p=0.004$ ) para o mesmo pé de teste.

**Table 2/ Tabela 2** - Spearman's components comparison obtained by LDF and PPG in both experimental protocols (upward and downward). Rho coefficients and p for each protocol are shown for the test and contralateral feet (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ )  
 Comparação de Spearman dos componentes obtidos por LDF e PPG em ambos os protocolos experimentais (para cima e para baixo). Os coeficientes de Rho e p para cada protocolo são mostrados para os pés teste e contralateral (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ )

LDF vs PPG FLD vs FPG	Test foot Pé teste	Contralateral control foot Pé controlo contralateral
Cardiac / Cardíaco upM dwM	$\rho = 0.468$ ; $p = 0.014^*$ $\rho = 0.559$ ; $p = 0.002^{**}$	$\rho = 0.359$ ; $p = 0.066$ $\rho = 0.426$ ; $p = 0.027^*$
Respiratory / Respiratório upM dwM	$\rho = 0.327$ ; $p = 0.096$ $\rho = 0.247$ ; $p = 0.223$	$\rho = 0.645$ ; $p < 0.001^{**}$ $\rho = 0.483$ ; $p = 0.011^{**}$
Myogenic / Miogénico upM dwM	$\rho = 0.533$ ; $p = 0.004^{**}$ $\rho = 0.699$ ; $p < 0.001^{**}$	$\rho = 0.410$ ; $p = 0.034^*$ $\rho = 0.587$ ; $p = 0.001^{**}$
Sympathetic / Simpático upM dwM	$\rho = 0.208$ ; $p = 0.298$ $\rho = 0.542$ ; $p = 0.004^{**}$	$\rho = 0.391$ ; $p = 0.044^*$ $\rho = 0.509$ ; $p = 0.007^{**}$
EndoNOD upM Protocol dwM Protocol	$\rho = 0.270$ ; $p = 0.173$ $\rho = 0.272$ ; $p = 0.169$	$\rho = 0.473$ ; $p = 0.013^*$ $\rho = 0.401$ ; $p = 0.038^*$
EndoNOi upM dwM	$\rho = 0.179$ ; $p = 0.371$ $\rho = 0.374$ ; $p = 0.055$	$\rho = 0.365$ ; $p = 0.061$ $\rho = 0.275$ ; $p = 0.165$



for the control foot ( $p < 0.001$ ) was also shown. For the myogenic component, a significant correlation was detected in both feet ( $p = 0.004$  for test foot and  $p = 0.034$  for control foot) while for the sympathetic component, a non-significant correlation was detected in the test foot, and a significant correlation for the control foot ( $p = 0.044$ ). Regarding the endoNOD component, a non-significant correlation was shown in the test foot and a significant correlation for the control foot ( $p = 0.013$ ). For endoNOI component, a non-significant correlation was noted for both feet. For the dwM protocol, the cardiac component shows a significant correlation in both feet ( $p = 0.002$  for tested foot and  $p = 0.027$  for control foot), while the respiratory component showed a non-significant correlation in the test foot and a significant correlation in the control foot ( $p = 0.011$ ). Regarding the myogenic component, a significant correlation was shown in both feet ( $p < 0.001$  for the test foot and  $p = 0.001$  for the control foot), while the sympathetic component showed a significant correlation in both feet ( $p = 0.004$  for the test and  $p = 0.007$  for the control). Regarding the endothelial components, the endoNOD showed a non-significant correlation for the test foot and a significant correlation for the control foot ( $p = 0.038$ ) while, a non-significant correlation was noted for both feet (Table 2) for the endoNOI.

## Discussion

Massage has long been regarded as a non-conventional procedure, supported by experience and evidence-based results. It serves, nevertheless, a broad range of applications reflecting its growing demand and popularity. Our studies on massage effects over microcirculation in vivo tend to contribute to a more mechanistic definition of the procedure by identifying the main physiological intervenients<sup>23, 7, 24</sup>. We have chosen the “effleurage” technique, which consists on soft stroking with both hands<sup>16</sup>, a reference in clinical practice involving the movement application in the upward direction, and compare it with movement in the opposite direction<sup>24</sup>. Additionally, we have chosen modern, easy-to-use non-invasive register systems, such as PPG, and compare it

A Tabela 2 contém a análise de correlação entre FLD e FPG para os dois protocolos. Em relação ao protocolo de Ma, observa-se uma correlação significativa para a componente cardíaca ( $p = 0.014$ ) no pé teste e uma correlação não significativa para o pé controle. Também é mostrada uma correlação não significativa para a componente respiratória no pé de teste e uma correlação significativa para o pé de controle ( $p < 0.001$ ). Para a componente miogénica, é detetada uma correlação significativa em ambos os pés ( $p = 0.004$  para o pé teste e  $p = 0.034$  para o pé controle), enquanto para a componente simpática, foi detetada uma correlação não significativa no pé teste e uma correlação significativa no pé controle ( $p = 0.044$ ). Em relação à componente endoNOD, uma correlação não significativa é mostrada no pé teste e uma correlação significativa no pé controle ( $p = 0.013$ ). Para a componente endoNOI, nota-se uma correlação não significativa para os dois pés. Para o protocolo de Md, a componente cardíaca apresenta uma correlação significativa em ambos os pés ( $p = 0.002$  para o pé teste e  $p = 0.027$  para o controle), enquanto a componente respiratória mostra uma correlação não significativa no pé teste e uma correlação significativa no pé de controle ( $p = 0.011$ ). Em relação à componente miogénica, é demonstrada uma correlação significativa em ambos os pés ( $p < 0.001$  para o pé teste e  $p = 0.001$  para o pé controle), assim como a componente simpática apresenta também uma correlação significativa em ambos os pés ( $p = 0.004$  para o teste e  $p = 0.007$  para o controle). Em relação às componentes endoteliais, a endoNOD mostra uma correlação não significativa para o pé teste e uma correlação significativa para o pé controle ( $p = 0.038$ ) enquanto que em relação ao endoNOI, nota-se uma correlação não significativa para os dois pés (Tabela 2).

## Discussão

A massagem é há muito considerada como um procedimento não convencional, apoiado pela experiência e resultados baseados na evidência. Esta serve, no entanto, uma ampla gama de aplicações, refletindo a sua crescente procura e popularidade. Os nossos estudos sobre os efeitos da massagem na microcirculação in vivo tendem a contribuir para uma definição mais mecanicista do procedimento, identificando os principais intervenientes fisiológicos<sup>23, 7, 24</sup>. Escolhemos a técnica de afloramento, que consiste no movimento suave com as duas mãos<sup>16</sup>, uma referência na prática clínica que envolve a mobilização no sentido ascendente, e comparamos com o movimento na direção oposta<sup>24</sup>. Além disso, escolhemos sistemas de leitura não invasivos,

with reference technologies such as LDF<sup>4,7,6</sup>. This new generation of PPG instrumentation and software have greatly improved the signal acquisition and readability by enhanced filtering, using separating sensor, acquisition and transmission power supplies, reducing main sources of noise such as wires<sup>25</sup>. Taken together, this improvement guarantees better signal quality (Figure 2), while apparently allowing a similar level of mathematical modelling analysis by the WT as LDF<sup>26</sup>.

As shown in Table 1, where LDF and PPG raw signals are compared in each phase of both massage protocols, we can see that these two techniques are highly and significantly correlated, especially in Phases I and III. In Phase II, the Rho decreases and for the downward protocol the statistical significance disappears. In fact, this might already suggest that these two protocols have different impacts on the regional circulation, most probably related with the different mobilizations affecting perfusion toward (downward) or away (upward maneuver) sensors. However, this analysis also confirms another intriguing, recently suggested,<sup>27</sup> feature- that the response to the massage in the test limb also impacts the contralateral limb. This is apparent in the example shown in Figure 2 where an increased perfusion, with lower magnitude, is noted in the contralateral limb a few moments after massage begins. This likely involves a centrally mediated regulation mechanism that maintains circulatory homeostasis in the lower limb region, a mechanism that should be further investigated.

WT from both technologies allowed the decomposition of each signal in its components, revealing similar oscillatory features (Figures 2 and 3) in both protocols during the massage (Phase II). A decrease in the cardiac component and an increase in respiratory components were detected for both protocols and technologies, although not significantly in all cases. The myogenic activity increased, confirming the same observation published before related with the blood pressure decrease<sup>7,24,15</sup>. The sympathetic component also decreased in both signals, with both protocols, which could also contribute to increase perfusion. Other previous studies reported an increase in the parasympathetic activity<sup>18</sup> eventually related with the pulse rate and blood pressure decrease found with both LDF and PPG signals<sup>7</sup>. The decrease of endoNOD and endoNOI components during massage for both technologies and protocols would presume a decrease in blood flow in the lower limb, although the increase in the myogenic component and the simultaneous decrease in the sympathetic component promotes an increase in blood flow which overcomes the physiological effect of the endothelium components decrease and explains the increase in blood flow in lower limb here observed as previously described<sup>7</sup>.

modernos e fáceis de usar, como o FPG, e compará-los com tecnologias de referência, como a FLD<sup>4,7,6</sup>. Esta nova geração de FPG melhorou muito a aquisição e a legibilidade do sinal utilizando filtros, separação das fontes de alimentação de aquisição e transmissão, reduzindo as principais fontes de ruído, tais como os fios<sup>25</sup>. Em suma, garantindo melhor qualidade de sinal (Figura 2), enquanto permite aparentemente um nível semelhante de análise de modelagem matemática com a TO como a FLD<sup>26</sup>.

Conforme apresentado na Tabela 1, onde os sinais brutos de FLD e FPG são comparados em cada fase dos dois protocolos de massagem, podemos ver que essas duas técnicas estão significativamente correlacionadas, em especial nas fases I e III de ambos os protocolos. Na fase II o Rho diminui e, para o protocolo descendente, a significância estatística desaparece. De fato, isto pode já sugerir que esses dois protocolos têm impactos diferentes na circulação regional, provavelmente relacionados com as diferentes mobilizações que se aproximam (manobra descendente) ou se afastam (manobra ascendente) dos sensores de perfusão. Entretanto, esta análise também confirma outra característica intrigante, recentemente sugerida<sup>27</sup>, ou seja, que a resposta à massagem no membro teste também afeta o membro contralateral. Este efeito é muito claro no exemplo mostrado na Figura 2, onde um aumento da perfusão, com menor magnitude, é observado no membro contralateral alguns momentos após o início da massagem. Tal poderá envolver um mecanismo de regulação central, que mantém a homeostase circulatória na região inferior, que deverá ser melhor investigado.

A TO de ambas as tecnologias permitiu a decomposição de cada sinal nos seus componentes, revelando, em ambos os protocolos, características oscilatórias semelhantes (Figuras 2 e 3) durante a massagem (fase II). Uma diminuição na componente cardíaca e um aumento nos componentes respiratórios foram detetados para ambos os protocolos e tecnologias, embora não significativamente. A atividade miogénica aumentou, confirmando a mesma observação publicada anteriormente relacionada com a diminuição da pressão arterial<sup>7,24,15</sup>. A componente simpática também diminuiu em ambos os sinais, com ambos os protocolos, o que também poderia contribuir para o aumento da perfusão. Outros estudos relataram um aumento na atividade parassimpática<sup>18</sup>, eventualmente relacionada com a frequência de pulso e diminuição da pressão arterial encontrados com os sinais de FLD e FPG<sup>7</sup>. A diminuição dos componentes endoNOD e endoNOI durante a massagem para ambas as tecnologias e protocolos presumiria uma diminuição no fluxo sanguíneo no membro inferior, embora o aumento da componente miogénica e a diminuição simul-

LDF and PPG Spearman component analysis showed weak to moderate correlations although the direction of the component response is generally coincident between the two technologies (Figures 3 and 4). Therefore, comparing both technologies, by raw signals and WT components, we may conclude we found similar behaviour and responses, although a few differences prevail, especially for Phase III. The differences observed are likely related to the different light interactions occurring within the tissues<sup>28, 29, 30</sup>.

Finally, regarding the massage procedures, we found similar responses with both protocols, indicating that the physiological impact of the upward and the downward massage is nearly the same. Both protocols evoked perfusion changes in the same direction, and both protocols affected the contralateral limb, although the response to the upM maneuver seems to underline the importance of the myogenic component in the test foot.

## Conclusions

Our study demonstrates that a regional circulatory adaptation seems to take place even when a transitory event such as single limb massage, interferes with circulatory homeostasis in the limb pair. In this respect both massage manoeuvres show the same impact, although some differences are detected regarding the oscillatory components of LDF and PPG. The use of both technologies provide a more supported and sensitive analysis, but the modern PPG systems seem to be well-suited to quantitatively describe *in vivo* peripheral microcirculation.

## 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.

tânea da componente simpática promovam um aumento do fluxo sanguíneo que supera o efeito fisiológico da diminuição das componentes endoteliais, e explica o aumento do fluxo sanguíneo nos membros inferiores, aqui observado e anteriormente descrito<sup>7</sup>.

A análise de Spearman das componentes de FLD e FPG mostrou correlações fracas a moderadas, embora a direção da resposta da componente seja geralmente coincidente entre as duas tecnologias (Figuras 3 e 4). Portanto, comparando ambas as tecnologias, nos seus sinais brutos e nos seus componentes, podemos concluir que encontramos em geral, comportamentos e respostas semelhantes, embora algumas diferenças prevaleçam, especialmente para a fase III, provavelmente relacionada com as diferentes interações de luz que ocorrem nos tecidos<sup>28, 29, 30</sup>.

Finalmente, em relação aos procedimentos de massagem, encontramos respostas semelhantes com ambos os protocolos, o que significa que o impacto fisiológico da massagem ascendente e descendente está muito próximo. Ambos os protocolos evocaram alterações de perfusão na mesma direção, ambos os protocolos afetaram o membro contralateral, embora a resposta à manobra de Ma pareça sublinhar a importância da componente miogénica no pé teste.

## Conclusões

O nosso estudo demonstra que ocorre uma adaptação circulatória regional mesmo quando um evento transi-tório, como no caso a massagem de um membro tem lugar, interferindo na homeostase circulatória de ambos os membros. A esse respeito, ambas as manobras de massagem mostram igualmente o mesmo impacto, pese embora algumas diferenças sejam detetadas em relação aos componentes oscilatórios do FLD e do FPG. O uso de ambas as tecnologias fornece uma análise mais fina e apoiada, mas este novo sistema FPG parece ser perfeitamente adequado para descrever quantitativamente a microcirculação periférica *in vivo*.

## 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.

## Conflict of Interests

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

## 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. Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol* 2008; 105: 370–372.
2. Silva H, Rocha C, Brazález BN, Ferreira H, Rodrigues LM. Looking further into photoplethysmography components to study skin circulation. *ISBS WC2016 Abst. Book*, P51, pp90, 2016
3. Rajan V, Varghese B, van Leeuwen TG, Steenbergen W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers Med Sci*. 2009; 24:269–283.
4. Silva H, Rocha C, Rodrigues LM. Combining laser Doppler flowmetry and photoplethysmography to explore in vivo vascular physiology. *Biomed Biopharm Res*. 2016; 13(2):209-217; doi: 10.19277/bbr.13.2.139.
5. Sahni R. Noninvasive monitoring by photoplethysmography. *Clin Perinatol*. 2012; 39(3):573-83.
6. Silva H, Ferreira H, Tavares L, Bujan J, Rodrigues LM. Exploring in vivo models to characterize peripheral microcirculation – a pilot study. *Biomed Biopharm Res*. 2013; (10)1:65-72; DOI: 10.19277/bbr.10.1.52.
7. Rocha C, Silva H, Ferreira H, Rodrigues LM. About the in vivo discriminatory capacity of photoplethysmography versus laser Doppler flowmetry. *Biomed Biopharm Res* 2017; (14)1:37-44. DOI: 10.19277/bbr.14.1.148
8. Silva H, Bento M, Vieira H, Rodrigues LM. Comparing the spectral components of laser Doppler flowmetry and photoplethysmography signals for the assessment of the vascular response to hyperoxia. *Biomed Biopharm Res*. 2016; 14(2):187-194; doi: 10.19277/bbr.14.2.161.
9. Shirado WH, Moreira MA, Palma JG, Barbon Júnior S. Estudo comparativo entre algoritmos das transformadas discretas de Fourier e Wavelet, *Revista Brasileira de Computação Aplicada*, 2015, v. 7, n. 3, p. 97-107, doi: 10.5335/rbca.2015.4880.
10. Beck TW, Housh TJ, Johnson GO, Weir JP, Cramer JT, Coburn JW, Malek MH. Comparison of Fourier and wavelet transform procedures for examining mechanomyographic and electromyographic frequency versus isokinetic torque relationships. *Electromyogr Clin Neurophysiol*; 2005;45(2):93-103.
11. Bollinger A, Yanar A, Hoffman U, Franzeck UK: Is high frequency fluxmotion due to respiration or to vasomotion activity? In: *Progress in Applied microcirculation*. K Messmer (ed), Karger, Basel, 1993, pp 52-55.
12. Stefanovska A, Kroselj P: Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions. *Open Syst Inf Dyn* 1997; 4: 457-478,
13. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, Stefanovska A, Kvernmo HD, Kirkeboen 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.
14. Mizeva I, Di Maria C, Frick P, Podtaev S, Allen J. Quantifying the correlation between photoplethysmography and laser Doppler flowmetry microvascular low-frequency oscillations. *Journal of Biomedical Optics* 20(3), 037007 (March 2015). doi: 10.1117/1.JBO.20.3.037007.
15. Stergiopulos N, Porret CA, De Brouwer S, Meister JJ. Arterial vasomotion: effect of flow and evidence of nonlinear dynamics. *American Journal of Physiology*. 1998;274(6-2):H1858-64.
16. Goats, GC, *Massage – the scientific basis of an ancient art: part 2. Physiological and therapeutic effects*. *Br J Sports Med*, 1994, 28:153-156.
17. Weerapong, P et al., *The Mechanisms of Massage and Effects on Performance, Muscle Recovery and Injury Prevention*. *Sports Med*, 2005, 35(3), 235-256.
18. Çınar Ş, Eşer İ, Khorshid L. The effects of Back Massage on the Vital Signs and Anxiety Level of Elderly Signs and Anxiety Level of Elderly Staying in a Rest Home, Hacettepe University Faculty of Health Sciences Nursing Journal. 2009; 16(2): 14-21.
19. 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.
20. 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.
21. World Medical Association, *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. 2013; *JAMA*310, 2191– 2194.
22. Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Kirkeboen, K.A., Kvernebo, K., "Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators", *Microv. Res*. 1999; 57(3), 298-309
23. Rocha C, Silva H, Frazão I, Rodrigues LM. Assessing the effect of manual massage on the lower limb microcirculation. II *Jornadas Científicas CBIOS. Proceedings, Biomed Biopharm Res*. 2016; (13)2:273-290. doi: 10.19277/bbr.13.2.144.
24. Rocha C, Silva H, Ferreira H, Rodrigues LM. Characterizing the acute microcirculatory changes induced by massage in the human hind limb. *ISBS World Congress 2018 Proceedings, Skin Res Technol* (in press) 2018.
25. Allen J. Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement. *Physiol Meas*. 2007 Mar;28(3) : R1-39. doi: 10.1088/0967-3334/28/3/R01.
26. Silva H, Ferreira H, Bujan J, Rodrigues LM. The wavelet transform as a tool for the characterization of the vascular response in the human lower limb. *Biomed Biopharm Res*. 2014; 11(1):75-80; doi: 10.19277/bbr.11.1.78.
27. 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, <https://doi.org/10.14814/phy2.13736>.
28. Kamshilin AA, Nippolainen E, Sidorov IS, Vasilev PV, Erofeev NP, Podolian NP, Romashko RV. A new look at the essence of the imaging photoplethysmography. *Sci Rep*. 2015; 5:10494. doi: 10.1038/srep10494.
29. Kamshilin AA, Margaryants NB. Origin of photoplethysmographic waveform at green light. *Physics Procedia*. 2017; 86 : 72 – 80. doi: 10.1016/j.phpro.2017.01.024.
30. Mizeva I, Di Maria C, Frick P, Podtaev S, Allen J. Quantifying the correlation between photoplethysmography and laser Doppler flowmetry microvascular low-frequency oscillations. *J Biomed Opt*. 2015; 20(3):037007. doi: 10.1117/1.JBO.20.3.037007.