

Multilateral adaptive responses detected in vivo in the upper and lower limbs resulting from post-occlusive reactive hyperemia

Respostas adaptativas multilaterais detetadas in vivo nos membros superior e inferior resultantes da hiperemia reativa pós-oclusiva

Marisa Nicolai , Elisabete Silva , & Luís Monteiro Rodrigues 

Keywords: PORH, adaptive response, multilateral measurements, palmar and plantar skin, time to effective occlusion, LDF, temporal analysis

Palavras-chave: PORH, resposta adaptativa, medições multilaterais, pele palmar e plantar, tempo para oclusão efectiva, LDF, análise temporal

To Cite:

Nicolai, M. Silva, E., Monteiro Rodrigues, L. (2025) Multilateral adaptive responses detected in vivo in the upper and lower limbs resulting from post-occlusive reactive hyperemia *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(2), 1-16.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.2.372>

CBIOS – Centre for Research in Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:
monteiro.rodrigues@ulusofona.pt

Received / Recebido: 29/10/2025
Accepted / Aceite: 28/12/2025

Abstract

Post-occlusive reactive hyperemia (PORH) is a commonly used maneuver for assessing cutaneous microcirculation. Its responses are usually described as a local reaction to transient ischemia induced by occlusion. However, recent evidence suggests that PORH predominantly involves neural reflex mechanisms with systemic impact. In this study, we analyzed the effects of PORH applied to one limb on peripheral cutaneous perfusion and its physiological significance. PORH was applied in ten healthy young adults by occluding the brachial artery of one arm. Cutaneous perfusion was simultaneously recorded on the index finger of both hands and on the hallux of both feet, on glabrous skin, using laser Doppler flowmetry, before, during arterial occlusion, and during post-occlusive reperfusion. Data were analyzed using conventional temporal averaging and a phase-specific approach with high temporal resolution. Conventional analysis revealed significant perfusion changes only in the occluded limb, whereas phase-specific analysis demonstrated rapid perfusion reductions during occlusion in all extremities, suggesting the relevance of novel variables during both occlusion and reperfusion. These findings indicate that PORH triggers integrative microcirculatory responses that are not fully captured by simple comparisons of temporal averages.

Resumo

A hiperémia reativa pós-oclusiva (do inglês PORH) é uma manobra comum usada na avaliação da microcirculação cutânea. As suas respostas são normalmente referidas como uma resposta local à isquemia transitória induzida pela oclusão. No entanto, evidências recentes sugerem que a PORH envolve sobretudo mecanismos reflexos neurais com impacto sistémico. Aqui analisamos os efeitos da PORH aplicada num membro sobre a perfusão cutânea das extremidades e o seu significado. A PORH foi aplicada em dez adultos jovens saudáveis provocando a oclusão da artéria braquial de um dos braços. A perfusão cutânea foi registada simultaneamente no dedo indicador de ambas as mãos e no hálux de ambos os pés, na pele glabra, por fluxometria laser Doppler, antes, durante a oclusão arterial e na reperfusão pós-oclusiva. Os dados foram analisados por média temporal convencional e por uma abordagem específica por fases, com elevada resolução temporal. A análise convencional apenas revelou alterações significativas no membro ocluído, enquanto que a análise por fase mostrou reduções rápidas da perfusão durante a oclusão em todas as extremidades, sugerindo novas variáveis na oclusão e na reperfusão. Estes resultados sugerem que a PORH desencadeia respostas microcirculatórias integrativas não totalmente detetadas pela simples comparação de médias temporais.

Introduction

Human skin is an active interface between the body and the environment and, from this perspective, might be explored as a window into health and disease (1,2). The skin integrates multiple immune, vascular, neural, and endocrine pathways, assuming a central role in several adaptive responses (e.g., thermoregulation) with both local and systemic impact. Alterations in any of these modulators may modify cutaneous physiology (metabolic, inflammatory, hemodynamic) and signal the presence of a pathophysiological process. Beyond this diagnostic potential, the size and accessibility of the skin enable direct clinical observation, sample collection (e.g., histological), and non-invasive monitoring using a wide variety of technologies, sensors, and methodologies (3–6).

Reactive hyperemia (RH) and the post-occlusive reactive hyperemia maneuver (PORH) are classic examples of this approach in the study of cardiocirculatory adaptive physiology (7–9). PORH is commonly assessed in distal sites (fingers and toes) following a short period of arterial occlusion induced by a suprasystolic pressure within a cuff. Release of cuff pressure results in a rapid increase in blood perfusion (hyperemia), typically detected by non-invasive technologies, allowing the extraction of quantifiable variables (10–12). These responses have been associated with occlusion-induced ischemia and interpreted as a predominantly local phenomenon, resulting from the accumulation of endothelial mediators—particularly vasodilators—and myogenic relaxation (13–15). It is also accepted that these responses involve the nervous system and are influenced by transient changes in arterial inflow and venous outflow dynamics during the maneuver (16). Nevertheless, any reduction in the RH response is generally interpreted as a compromise of local microcirculatory homeostasis (17).

Our studies on this topic have shown that when applied to one limb, a measurable response consistently occurs simultaneously in the contralateral, non-stimulated limb (18). This has been observed, for example, following low-intensity, short-duration massage applied to the leg or activation of the venoarteriolar reflex (VAR) (17,19). These observations are comparable to the hyperemic responses recorded after PORH application in the upper limb.

Introdução

A pele humana constitui uma interface ativa entre o corpo e o ambiente e nessa perspetiva é explorada como uma janela para a saúde e doença (1,2). A pele integra múltiplas vias imunitárias, vasculares, nervosas e endócrinas, assumindo um papel central em várias respostas adaptativas (por exemplo, a termorregulação) com impacto tanto local como sistémico. Alterações em qualquer um destes moduladores podem modificar a fisiologia cutânea (metabólica, inflamatória, hemodinâmica) e sinalizar a presença de um processo fisiopatológico. Para além deste potencial diagnóstico, a dimensão e a acessibilidade da pele permitem a fácil observação clínica direta, a colheita de amostras (histológicas) e a monitorização não invasiva, através de uma ampla variedade de tecnologias, sensores e metodologias (3–6).

A hiperémia reativa (RH) e a manobra de hiperémia reativa pós-oclusiva (do inglês post-occlusive reactive hyperemia, PORH) constituem um exemplo clássico desta abordagem no estudo da fisiologia de adaptação cardiocirculatória (7–9). A PORH é habitualmente avaliada em zonas distais (dedos das mãos e dos pés), após um curto período de oclusão arterial induzida por uma manga insuflável com pressão suprassistólica. A libertação da pressão da manga origina um aumento rápido da perfusão sanguínea (hiperémia), geralmente detetado por tecnologias não invasivas, permitindo a obtenção de variáveis quantificáveis (10–12). Estas respostas têm sido associadas à isquemia alegadamente induzida pela oclusão e interpretadas como um fenómeno predominantemente local, resultante da acumulação de mediadores endoteliais, sobretudo vasodilatadores, e do relaxamento miogénico (13–15). É igualmente aceite que estas respostas envolvem o sistema nervoso, influenciadas por alterações transitórias do influxo arterial e da dinâmica de esvaziamento venoso no decurso da manobra (16). Ainda assim, qualquer redução da resposta de RH é geralmente interpretada como um compromisso da homeostasia microcirculatória local (17).

Os nossos estudos sobre este tema demonstraram que, quando aplicada a um membro, surge sempre uma resposta mensurável simultaneamente no membro contralateral não estimulado (18). Tal foi observado, por exemplo, com a aplicação de uma massagem de baixa intensidade e curta duração na perna ou com a ativação do reflexo venoarteriolar (VAR) (17,19).

Such findings suggest that RH-PORH should not be considered a strictly local response, but rather one that may involve neural, reflex-mediated influences, likely of autonomic origin, contributing to the rapid regulation of sudden hemodynamic variations (20,21). From this perspective, PORH may be understood as an integrative regulatory process in which systemic and local control mechanisms dynamically interact during the occlusion and reperfusion phases.

This framework also implies the need for a new approach to interpreting PORH responses. Perfusion changes during occlusion and reperfusion are temporally heterogeneous and reflect multiple regulatory processes, which may occur even when maximal hyperemic responses are similar. This phase-specific heterogeneity may be particularly relevant when comparing responses between upper and lower limbs, as cutaneous perfusion in the lower limbs exhibits distinct behavior under both resting and dynamic conditions (22). Phase-specific analysis enables the identification of differentiated patterns of microvascular adjustment over time and across anatomical regions, reflecting differences in vascular architecture, hydrostatic pressure, and neural control, which may lead to heterogeneous perfusion across the various phases of the PORH protocol.

The present study was designed to determine how a PORH maneuver applied to a single limb induces measurable and coordinated perfusion changes in all four limbs. The primary objective was to characterize phase-dependent adaptive responses—namely during occlusion and post-occlusive reperfusion—in both upper and lower limbs, using temporal parameters to describe local perfusion kinetics. Secondarily, other variables potentially better suited to describing reflex-mediated response mechanisms were explored. By integrating spatial and temporal analyses, this study aims to deepen the understanding of cardiovascular physiological adaptation during and following transient arterial occlusion.

Estas observações são semelhantes às respostas hiperémicas registadas após a aplicação de PORH no membro superior. Estes resultados sugeriram que a RH-PORH não deve ser considerada uma resposta estritamente local, podendo envolver influências neurais mediadas por reflexos, provavelmente de origem autonómica, que contribuem para a rápida regulação de variações hemodinâmicas súbitas (20,21). Nesta perspetiva, a PORH pode ser entendida como um processo regulador integrativo, em que os mecanismos de controlo sistémico e local interagem de forma dinâmica durante as fases de oclusão e de perfusão.

Este enquadramento implica igualmente a necessidade de uma nova abordagem na interpretação das respostas de PORH. As alterações de perfusão durante a oclusão e a perfusão são temporalmente heterogêneas e refletem múltiplos processos reguladores, podendo ocorrer mesmo quando as respostas hiperémicas máximas são semelhantes. Esta heterogeneidade específica por fase pode ser particularmente relevante na comparação de respostas entre os membros superiores e inferiores, uma vez que a perfusão cutânea dos membros inferiores apresenta um comportamento distinto, tanto em condições de repouso como em condições dinâmicas (22). A análise específica por fases permite identificar padrões diferenciados de ajustamento microvascular ao longo do tempo e entre regiões anatómicas, refletindo diferenças na arquitetura vascular, na pressão hidrostática e no controlo neural, que podem conduzir a perfusões heterogêneas ao longo das várias fases do protocolo de PORH.

O presente estudo foi concebido de modo a determinar como a manobra de PORH aplicada a um único membro provoca alterações mensuráveis e coordenadas da perfusão em todos os quatro membros. O objetivo principal consistiu na caracterização das respostas adaptativas fase-dependentes, isto é, durante a oclusão e na perfusão pós-oclusiva, nos membros superiores e inferiores, recorrendo a parâmetros temporais para descrever a cinética local da perfusão. Secundariamente, foram exploradas outras variáveis potencialmente mais adequadas à descrição do mecanismo de resposta mediado por reflexos. Ao integrar as análises espacial e temporal este estudo procura aprofundar o conhecimento acerca da adaptação da fisiologia cardiovascular durante e após a oclusão arterial temporária.

Methods

Participants

A convenience sample was recruited from the university community. The sample comprised ten young, healthy participants of both sexes (eight females and two males), with a mean age of 21.5 ± 2.1 years. All participants were non-smokers with no history of cardiovascular, metabolic, neurological, or dermatological disease. None were taking vasoactive drugs, other medications, or supplements with vascular effects. Participants were instructed to abstain from caffeine and alcohol consumption and from vigorous physical activity for at least 24 hours prior to the experimental session. Table 1 presents the general characteristics of the study participants.

Ethical considerations

All procedures were conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and subsequent revisions, as established by the World Medical Association (23), which serves as a reference for research involving human participants. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of Universidade Lusófona/CBIOS (Process CE.ECTS/P10.21).

Experimental protocol

Experiments were performed in a temperature- and humidity-controlled environment (21 ± 2 °C; 40–60%, respectively). Participants underwent an acclimatization period of (at least) 15–20 minutes before data acquisition, seated at rest, with the forearms positioned in front of the body in pronation, palms facing downward, and the lower limbs flexed at the hips and knees, barefoot, with the feet resting on the floor. Limb posture was standardized throughout the protocol, as changes in limb position may influence reactive hyperemia recordings (24).

A pressure cuff was placed around a randomly selected arm at the level of the brachial artery. Measurements included a baseline recording (phase 1), followed by an occlusion phase achieved by rapid cuff inflation to 200 mmHg, maintained for 2 minutes (phase 2), and, after cuff deflation, a reperfusion phase with continuous recording for a minimum of 10 minutes (phase 3).

Métodos

Participantes

Uma amostra de conveniência foi selecionada numa comunidade universitária. Esta amostra incluiu dez participantes jovens e saudáveis, de ambos os sexos (oito do sexo feminino e dois do sexo masculino) com idade média de $21,5 \pm 2,1$ anos. Todos são não fumadores sem antecedentes de doença cardiovascular, metabólica, neurológica ou dermatológica. Nenhum se encontrava a tomar fármacos vasoativos, outra medicação ou suplementação com impacto vascular. Foi requerido a todos os participantes que se abstivessem do consumo de cafeína, álcool e da prática de atividade física vigorosa durante pelo menos 24 horas antes da sessão experimental. A Tabela 1 apresenta as características gerais dos participantes do estudo.

Considerações éticas

Os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e revisões subsequentes, tal como estabelecido pela Associação Médica Mundial (23), referência para a investigação envolvendo participantes humanos. O protocolo do estudo foi aprovado pela Comissão de Ética Institucional da Universidade Lusófona/CBIOS (Processo CE.ECTS/P10.21).

Protocolo experimental

Os ensaios foram realizados num ambiente com temperatura e humidade controladas (21 ± 2 °C; 40-60%, respetivamente). Os participantes permaneceram em aclimatização a estas condições por (pelo menos) 15–20 minutos antes do início da aquisição de dados, sentados em repouso, com os antebraços posicionados à frente do corpo em pronação, as palmas das mãos voltadas para baixo e membros inferiores fletidos ao nível das ancas e joelhos, pés descalços e apoiados no solo. A postura dos membros foi padronizada ao longo de todo o protocolo, uma vez que alterações na posição dos membros podem influenciar o registo das respostas de hiperémia reativa (24).

A manga de pressão foi colocada em torno de um dos braços, selecionado aleatoriamente, ao nível da artéria braquial. As medições incluíram um registo basal (fase 1), seguido de uma fase de oclusão, insuflação rápida da manga até 200 mmHg, mantida durante 2 minutos (fase 2) e após o esvaziamento da manga, uma fase de perfusão com medição contínua num intervalo mínimo de 10 minutos (fase 3).

Table 1 - General characteristics of the study participants. Values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (mean $\pm$ SEM). Ankle-Brachial Index (ABI), Body Mass Index (BMI).

Tabela 1 - Características gerais dos participantes do estudo. Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (média $\pm$ SEM). Índice Tornozelo-Braço (ITB), Índice de Massa Corporal (IMC).

Participants / Participantes (n=10)	mean $\pm$ SEM / média $\pm$ SEM
Age / Idade	21.5 $\pm$ 0.7 years / anos
Body mass / Massa corporal	66.1 $\pm$ 2.9 kg
Height / Altura	1.7 $\pm$ 0.0 m
BMI / IMC	24.1 $\pm$ 1.0 kg m ⁻²
ABI / ITB	1.1 $\pm$ 0.1
Systolic blood pressure / Pressão arterial sistólica	107.9 $\pm$ 4.2 mmHg
Diastolic blood pressure / Pressão arterial diastólica	71.9 $\pm$ 4.7 mmHg
Heart rate / Frequência cardíaca	73.6 $\pm$ 3.5 bpm

Cutaneous perfusion was simultaneously recorded in the upper and lower limbs at four peripheral sites: the palmar surface of the index fingers of both hands and the plantar surface of the great toes (hallux), using dual-channel laser Doppler flowmetry (moorVMS-LDF2, Moor Instruments Ltd., UK) equipped with VP1T probes. Signals were acquired at 40 Hz using the manufacturer's software, ensuring adequate temporal resolution for analyzing rapid changes in peripheral perfusion. All recordings were inspected to avoid motion-related artifacts or signal disturbances.

For clarity and consistency, measurements obtained from the index finger of the hand and from the hallux of the foot are hereafter referred to as hand perfusion and foot perfusion, respectively.

Data processing and temporal segmentation

To address the study objectives, microvascular perfusion data were analyzed using two complementary analytical frameworks applied to the same recordings: conventional analysis and phase-specific analysis. In the conventional approach, perfusion signals were segmented according to the classical PORH methodology. A single representative perfusion value was obtained for each of the three phases, calculated as the mean of all samples acquired within a given time interval, allowing comparison with previous studies (17–19).

A perfusão cutânea foi registada simultaneamente nos membros superiores e inferiores, em quatro locais periféricos, a face palmar dos dedos indicadores de ambas as mãos e a face plantar dos dedos grandes do pé (halux) através da fluxometria de laser Doppler de duplo canal (moorVMS-LDF2, Moor Instruments Ltd., Reino Unido), equipada com sondas VP1T do mesmo fabricante. Os sinais foram adquiridos a 40 Hz utilizando o software do fabricante, garantindo uma resolução temporal adequada para a análise de alterações rápidas na perfusão periférica. Todos os registos foram verificados de modo a evitar artefactos relacionados com movimentos ou perturbações do sinal.

Para efeitos de clareza e consistência, as medições obtidas nos dedos indicador da mão e no halux no pé serão doravante designadas, respetivamente, como perfusão da mão e perfusão do pé.

Processamento dos dados e segmentação temporal

Para responder aos objetivos do estudo, os dados de perfusão microvascular foram analisados através de dois enquadramentos analíticos complementares, análise convencional e análise específica por fases, aplicados aos mesmos registos. Na abordagem analítica convencional, os sinais de perfusão foram segmentados de acordo com a metodologia clássica de PORH. Para cada uma das três fases foi obtido um único valor representativo de perfusão, calculado como a média de todas as amostras adquiridas num intervalo temporal, permitindo a comparação com estudos prévios (17-19).

In parallel, a phase-specific analytical approach with high temporal resolution was implemented to preserve temporal dynamics and characterize rapid microvascular adjustments that may be attenuated by prolonged averaging. In this approach, the baseline phase (phase 1) was defined as the 30 seconds immediately preceding cuff inflation, providing a temporally precise reference of the physiological state prior to arterial occlusion.

During occlusion (phase 2), perfusion was analyzed in short temporal windows corresponding to the first 10, 15, 30, and 60 seconds after application of occlusive pressure. Mean perfusion values within these intervals were used to capture early perfusion dynamics associated with arterial inflow interruption, particularly in non-occluded limbs. The initial descending segment between baseline perfusion and the observed minimum perfusion plateau was excluded to avoid distortion of early occlusion dynamics.

During reperfusion (phase 3), results were analyzed using identical temporal windows (10, 15, 30, and 60 seconds) following the inflection point of the curve at which the positive slope of the ipsilateral limb begins to attenuate and were compared with the corresponding value from the first 30 seconds of the minimum perfusion plateau of phase 2. The final 3 minutes of this phase, corresponding to late reperfusion, were also compared with phase 1 to assess the return to baseline values.

In addition to phase-based comparisons, a temporal kinetic parameter — the time to effective occlusion (TO) — was evaluated. TO was defined as the interval corresponding to the transient phase of perfusion reduction induced by cuff inflation, delimited by the onset of abrupt perfusion decrease, reflecting rapid arterial flow reduction, and the inflection point at which the negative slope of the perfusion curve began to attenuate prior to establishment of the minimum perfusion plateau.

This parameter was included as a kinetic descriptor of the initial perfusion suppression dynamics, noting that it has not been reported previously in the PORH literature. Importantly, TO represents an event-based temporal descriptor reflecting response timing and is independent of the mean perfusion values calculated within predefined temporal windows.

Em paralelo, foi implementada uma abordagem analítica específica por fases, de elevada resolução temporal, com o objetivo de preservar a dinâmica temporal e caracterizar ajustamentos microvasculares rápidos que podem ser atenuados por médias prolongadas. Nesta abordagem, a fase basal (fase 1) foi definida como os 30 segundos imediatamente anteriores à insuflação da manga, proporcionando uma referência temporalmente precisa do estado fisiológico antes da oclusão arterial.

Durante a oclusão (fase 2), a perfusão foi analisada em janelas temporais curtas, correspondentes aos primeiros 10, 15, 30 e 60 segundos após a aplicação da pressão oclusiva. Os valores médios de perfusão nestes intervalos foram utilizados para captar a dinâmica precoce da perfusão associada à interrupção da perfusão arterial, particularmente nos membros não ocluídos. O segmento descendente inicial entre a perfusão basal e o patamar de perfusão mínima observado foi excluído de modo a evitar distorções na análise das dinâmicas iniciais da oclusão.

Durante a reperfusão (fase 3), os resultados foram analisados em janelas temporais idênticas (10, 15, 30 e 60 segundos) após o ponto de inflexão da curva em que o declive positivo do membro ipsilateral começa a atenuar e comparados com o valor correspondente aos primeiros 30 segundos do patamar de perfusão mínima da fase 2. Os últimos 3 minutos desta fase, correspondentes ao que podemos chamar de reperfusão tardia, foram ainda comparados com a fase 1, com o objetivo de analisar o retorno aos valores basais.

Para além das comparações baseadas em fases, foi adicionalmente avaliados um parâmetro cinético temporal, o tempo para oclusão efetiva (TO) definido como o intervalo temporal correspondente à fase transitória de redução de perfusão induzida pela insuflação da manga, delimitado pelo início da redução abrupta da perfusão, refletindo a rápida diminuição do fluxo sanguíneo arterial, e pelo ponto de inflexão da curva de perfusão em que o declive negativo começa a atenuar, antes do estabelecimento do patamar mínimo de perfusão.

Este parâmetro foi incluído como um descritor cinético da dinâmica inicial de supressão da perfusão, reconhecendo-se que não constitui uma variável previamente citada na literatura do PORH. Importa salientar que o TO corresponde a um descritor temporal baseado em eventos concretos, refletindo a temporização da resposta e sendo independente dos valores médios de perfusão calculados nas janelas temporais pré-definidas.

The phase-specific analytical approach constituted the primary analytical framework of the present study, while the conventional approach was retained to ensure comparability with existing PORH literature.

Statistical analysis

Descriptive and inferential statistical analyses were performed using non-parametric methods, given the small sample size and the non-normal distribution of perfusion data, specifically employing the Wilcoxon test for paired samples.

All analyses were conducted intralocally, with each anatomical measurement site considered an independent experimental unit. Perfusion variations induced by occlusion and reperfusion were analyzed relative to reference values defined at the same site; no direct statistical comparisons were performed between different limbs or between ipsilateral and contralateral sites.

In the conventional analytical approach, intralocal comparisons were performed between baseline perfusion (phase 1) and the predefined phases of the experimental protocol (occlusion, early reperfusion, and late reperfusion).

In the phase-specific analytical approach, a detailed temporal analysis of the microvascular response was conducted. Comparisons were made between baseline perfusion and discrete temporal intervals defined during occlusion, early post-occlusive reperfusion (10, 15, 30, and 60 seconds), and late reperfusion (final 180 seconds of recording). As is well known, PORH does not allow attainment of a true "zero" flow due to Brownian motion of interstitial macromolecules, red blood cell rheology, and differing sensitivities of measurement instruments (10,28,29).

Additionally, to characterize reperfusion magnitude as a function of the degree of occlusion achieved, perfusion values were also compared with the reference interval defined during occlusion (30 seconds). These comparisons allowed evaluation of the hyperemic response relative to the minimum perfusion level reached during occlusion, while maintaining the intralocal and paired nature of the analysis.

A abordagem analítica específica por fases constituiu o enquadramento analítico principal do presente estudo, enquanto a abordagem convencional foi mantida para assegurar a comparabilidade com a literatura existente sobre PORH.

Análise estatística

As análises estatísticas descritivas e inferenciais foram realizadas recorrendo a métodos não paramétricos, considerando a reduzida dimensão amostral e a distribuição não normal dos dados de perfusão utilizando o teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas.

Todas as análises foram conduzidas de forma intralocal, sendo cada local anatómico de medição considerado como unidade experimental independente. Nestes, as variações de perfusão induzidas pela oclusão e pela reperusão foram analisadas relativamente a referenciais definidos no mesmo local, não tendo sido efetuadas comparações estatísticas diretas entre diferentes membros, nem entre locais ipsilaterais e contralaterais.

Na abordagem analítica convencional, as comparações intralocais foram realizadas entre a perfusão basal (fase 1) e as fases pré-definidas do protocolo experimental (oclusão, reperusão precoce e reperusão tardia).

Complementarmente, na abordagem analítica específica por fases, foi efetuada uma análise temporal detalhada da resposta microvascular. Nesta abordagem, as comparações intralocais foram realizadas entre a perfusão basal e intervalos temporais discretos definidos durante a oclusão, a reperusão precoce pós-oclusão (10, 15, 30 e 60 segundos) e a reperusão tardia (últimos 180 segundos de registo). Como sabemos, a PORH não permite obter um verdadeiro "zero" fluxo devido ao movimento browniano de macromoléculas intersticiais, à reologia dos glóbulos vermelhos e às diferentes sensibilidades dos instrumentos de medição (10,28,29).

Adicionalmente, para caracterizar a magnitude da resposta de reperusão em função do grau de oclusão atingido, os valores de perfusão foram também comparados com o intervalo de referência definido durante a oclusão (30 segundos). Estas comparações permitiram avaliar a resposta hiperémica relativamente ao nível mínimo de perfusão alcançado durante a oclusão, mantendo-se sempre a natureza intralocal e emparelhada da análise.

Results are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). Statistical significance was set at $p < 0.05$. No correction was applied for multiple comparisons; consequently, the results should be interpreted as exploratory and as having potential to generate hypotheses..

Results

The mean perfusion values recorded simultaneously at all extremities in the participant group are shown in Figure 1. All results are presented as intralocal comparisons relative to the baseline value of the same anatomical site.

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$. Não foi aplicada correção para comparações múltiplas; consequentemente, os resultados devem ser interpretados como exploratórios e com potencial gerador de hipóteses.

Resultados

A Figura 1 ilustra os valores médios de perfusão registados simultaneamente em todas as extremidades num grupo de participantes. Todos os resultados são apresentados como comparações intralocais relativamente ao valor basal da mesma localização anatómica.

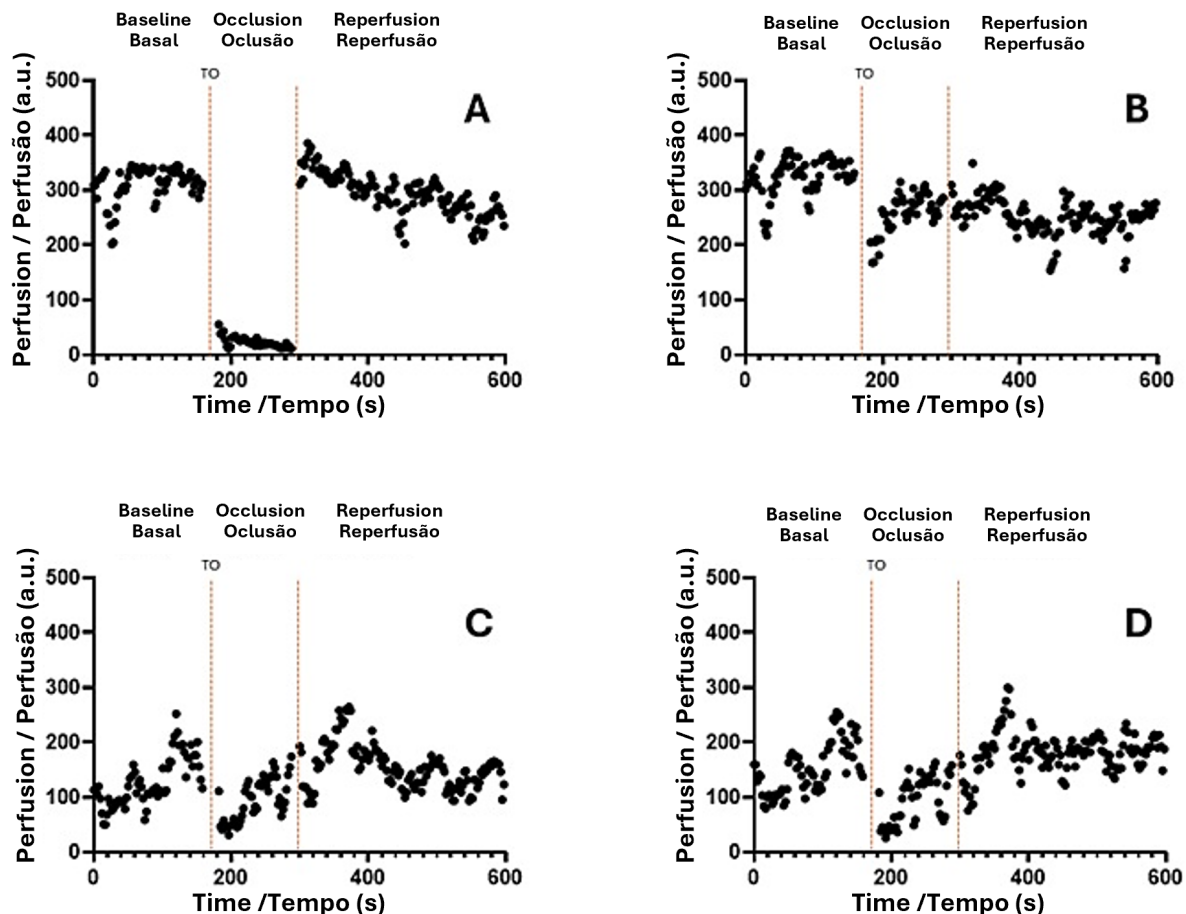


Figure 1 - Temporal evolution of skin perfusion registered in four limb extremities during a PORH manoeuvre depicting baseline, occlusion, and reperfusion recording as an illustrative example ($n=6$). A - the hand in the same arm where the pressure cuff was applied, B - the contralateral hand, C - the ipsilateral foot, and D - the contralateral foot. Time to effective occlusion (TO).

Figure 1 - Evolução temporal da perfusão cutânea registada nas extremidades dos quatro membros durante uma manobra PORH, ilustrando a linha de base, a oclusão e o registo da reperfusão como exemplo ilustrativo ($n=6$). A - a mão do mesmo braço onde foi aplicada a braçadeira de pressão, B - a mão contralateral, C - o pé ipsilateral e D - o pé contralateral. Tempo para a oclusão efetiva (TO).

Table 2 - Skin perfusion (mean $\pm$ SEM) was measured on the hands and feet at different phases of the protocol, using the conventional time means. Means obtained at occlusion and recovery were compared with the baseline using the Wilcoxon test for paired samples (** $p < 0.01$; ns, not significant).

Tabela 2 - Perfusão cutânea (média $\pm$ SEM) medida nas mãos e nos pés em diferentes fases do protocolo, utilizando a média temporal convencional. As médias obtidas na oclusão e na reperfusão foram comparadas com a fase basal pelo teste de Wilcoxon para amostras emparelhadas (** $p < 0,01$; ns, não significativo).

Phase / Fase			Hand/Mão		Foot/Pé	
			ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral
1	Baseline / Basal	Final 3 min / Últimos 3 min	268.7 $\pm$ 25.1	284.6 $\pm$ 30.3	120.9 $\pm$ 27.5	131.6 $\pm$ 32.4
2	Occlusion / Oclusão	2 min	20.3 $\pm$ 2.4 **	254.5 $\pm$ 29.7 ns	109.2 $\pm$ 28.4 ns	105.9 $\pm$ 31.6 ns
3	Reperfusion / Reperfusão	Early / Imediata 1st min / 1º min	319.7 $\pm$ 19.9 **	272.6 $\pm$ 30.6 ns	154.1 $\pm$ 36.1 ns	150.9 $\pm$ 37.8 ns
		2nd min / 2º min	299.7 $\pm$ 22.2 ns	267.3 $\pm$ 30.7 ns	159.5 $\pm$ 36.9 ns	166.3 $\pm$ 28.2 ns
	Late / Tardia	Final 3 min / Últimos 3 min	270.1 $\pm$ 31.5 ns	274.0 $\pm$ 34.7 ns	103.0 $\pm$ 31.6 ns	134.5 $\pm$ 33.8 ns

Conventional analysis

Conventional analysis revealed significant changes in cutaneous perfusion relative to baseline exclusively in the ipsilateral hand (Table 2). At this site, perfusion decreased significantly during the effective occlusion phase (defined as the period following TO). After release of the occlusion, a significant increase in perfusion was observed during the first minute of reperfusion, characterizing a transient hyperemic response (Figure 1A). During this period (immediate phase 3), perfusion exceeded baseline values and then gradually approached pre-occlusion levels during the late reperfusion phase.

No statistically significant differences were detected in the contralateral hand or in either foot during the effective occlusion phase or during reperfusion phases when compared with baseline (phase 1).

Phase-specific analysis

Phase-specific analysis allowed a detailed characterization of cutaneous perfusion dynamics during the transition to effective occlusion and throughout reperfusion. Baseline was defined as the mean perfusion over the 30 seconds immediately preceding cuff inflation.

During the initial phase of occlusion, a progressive and significant reduction in perfusion was observed in all analyzed extremities over the first minute (Table 3),

Análise convencional

A análise convencional revelou alterações significativas da perfusão cutânea relativamente ao valor basal exclusivamente na mão ipsilateral (Tabela 2). Neste local, a perfusão apresentou uma diminuição significativa durante a fase de oclusão efetiva (definida pelo período subsequente ao TO). Após a libertação da oclusão, observou-se um aumento significativo da perfusão durante o primeiro minuto de reperfusão, caracterizando uma resposta hiperémica transitória (Figura 1A). Neste período (fase 3 imediata), a perfusão ultrapassou os valores basais, aproximando-se posteriormente de forma progressiva dos níveis pré-occlusão ao longo da fase de reperfusão tardia.

Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas na mão contralateral, nem em ambos os pés, quer durante a fase de oclusão efetiva, quer durante as fases de reperfusão, quando comparadas com o valor basal (fase 1).

Análise de fases

A análise específica por fases permitiu caracterizar de forma detalhada a dinâmica da perfusão cutânea durante a transição para a oclusão efetiva e durante a reperfusão. O valor basal foi definido como a média dos 30 segundos imediatamente anteriores ao início da insuflação da manga.

Durante a fase inicial de oclusão, observou-se uma redução progressiva e significativa da perfusão em todas as extremidades analisadas ao longo

Table 3 - Skin perfusion (mean $\pm$ SEM) measured in the hands and feet across specific time segments of the protocol. During the occlusion phase and late reperfusion, differences were assessed relative to the baseline phase at the same location. The rapid reperfusion phase was compared with the reference interval defined after the time to effective occlusion (TO), corresponding to the effective occlusion period (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns, not significant).

Tabela 3 - Perfusão cutânea (média $\pm$ SEM) medida nas mãos e nos pés em segmentos temporais específicos do protocolo. Durante a fase de oclusão e a reperfusão tardia, as diferenças foram avaliadas relativamente à fase basal do mesmo local. A fase de reperfusão rápida foi comparada com o intervalo de referência definido após o tempo para a oclusão efetiva (TO), correspondente ao período de oclusão efetiva (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns, não significativo)

Phase / Fase			Hand / Mão		Foot / Pé		
			ipsilateral	contralateral	ipsilateral	contralateral	
1	Baseline / Basal	Final 30 s / Últimos 30 s	282.5 ± 24.1	310.4 ± 35.6	243.6 ± 30.0	355.8 ± 45.3	
2	Occlusion Oclusão	10 s	23.2 ± 4.2 **	195.0 ± 34.5 **	54.9 ± 17.4 *	47.3 ± 12.3 *	
		15 s	21.3 ± 4.1 **	203.5 ± 33.7 **	62.7 ± 21.6 *	54.7 ± 15.7 *	
		30 s	21.0 ± 3.2 **	219.6 ± 33.9 **	74.3 ± 24.6 *	67.5 ± 20.4 *	
		60 s	23.6 ± 2.9 **	234.6 ± 30.4 **	87.3 ± 23.9 *	81.1 ± 24.4 *	
3	Reperfusion / Reperfusão	Early / Imediata	10 s	342.8 ± 34.0 **	267.2 ± 34.5 ns	145.9 ± 17.4 **	144.1 ± 12.3 **
			15 s	336 ± 21.8 **	266.3 ± 31.1 ns	137.2 ± 33.2 **	139.2 ± 36.6 **
			30 s	332.1 ± 21.5 **	261.0 ± 33.5 ns	136.3 ± 36.7 **	134.3 ± 44.9 **
			60 s	319.7 ± 19.9 **	272.6 ± 30.6 ns	154.1 ± 36.1 **	150.9 ± 37.8 **
	Late / Tardia	Final 3 min / Últimos 3 min	300.3 ± 19.4 ns	268.6 ± 36.1 ns	115.1 ± 36.1 ns	363.5 ± 37.8 ns	

indicating a transient systemic response to the abrupt increase in external pressure and the consequent reduction in arterial inflow in the intervened limb.

The occlusion phase, also defined as the period following TO, corresponded to the interval during which perfusion reached relatively stable minimum values. Mean perfusion during this interval was used as a functional reference for analysis of the reperfusion response.

Following removal of external pressure, rapid and intense reperfusion occurred within the first minute, characterized by a significant increase in perfusion relative to values achieved during effective occlusion. With the exception of the contralateral upper limb, all

do primeiro minuto (Tabela 3), evidenciando uma resposta sistémica transitória ao aumento abrupto da pressão externa e à consequente diminuição do influxo arterial no membro intervencionado.

A fase de oclusão, igualmente definida pelo período subsequente ao TO, corresponde ao período em que a perfusão atinge valores mínimos relativamente estáveis. A média da perfusão neste intervalo foi utilizada como referência funcional para a análise da resposta de reperfusão.

Após remoção da pressão externa, verificou-se uma reperfusão rápida e intensa durante o primeiro minuto, caracterizada por um aumento significativo da perfusão relativamente aos valores atingidos durante a oclusão efetiva. Com exceção do membro superior contralateral, todos os restantes locais

other sites exhibited a significant hyperemic response when compared with the first 30 seconds of phase 2 (Table 3).

During late phase 3, perfusion progressively approached baseline values, with no statistically significant differences relative to the reference period (phase 1).

The time to effective occlusion (TO) is a temporal parameter characterizing the speed of the initial hemodynamic response triggered by cuff inflation. This interval reflects a transient period during which perfusion decreases abruptly and sustainably, reaching stable minimum values without complete collapse of the perfusion signal, consistent with the persistence of residual microvascular flow.

TO was quantified at all four analyzed sites, and no statistically significant differences were observed between limbs, suggesting a temporally homogeneous response to the occlusive stimulus (Figure 2).

apresentaram uma resposta hiperêmica significativa quando comparados com os primeiros 30 segundos da fase 2 (Tabela 3).

Durante a fase 3 tardia, a perfusão aproximou-se progressivamente dos valores basais, não se observando diferenças estatisticamente significativas relativamente ao período de referência (fase 1).

O Tempo para a Oclusão Efetiva (TO), um parâmetro temporal que caracteriza a rapidez da resposta hemodinâmica inicial desencadeada pela insuflação da manga. Este intervalo reflete um período transitório durante o qual a perfusão diminui de forma abrupta e sustentada, atingindo valores mínimos estáveis sem colapso completo do sinal de perfusão, em consonância com a persistência de fluxos residuais microvasculares.

Este TO foi quantificado nos quatro locais analisados, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas entre os membros, sugerindo uma resposta temporalmente homogênea ao estímulo oclusivo (Figura 2).

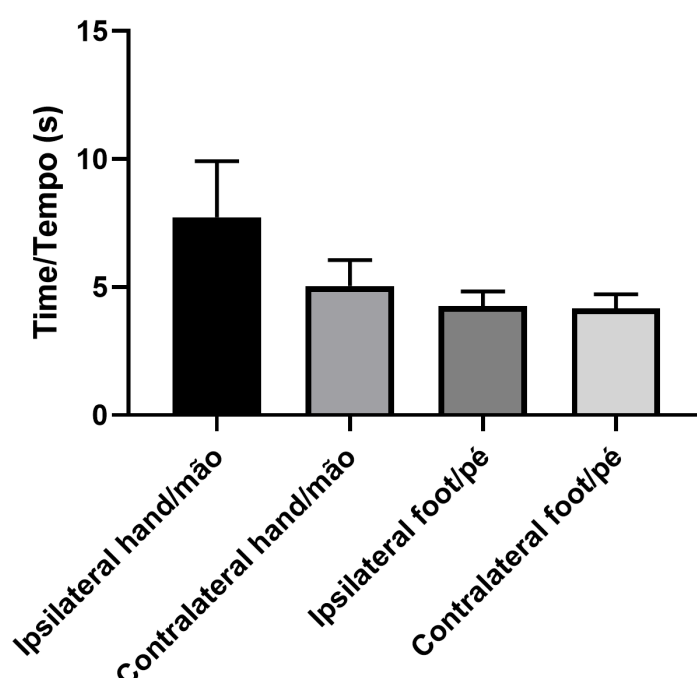


Figure 2 - Time to Effective Occlusion (TO) in the different limbs. Time interval (mean $\pm$ SEM) corresponding to the initial transient phase of occlusion, defined between the onset of the abrupt decrease in perfusion and the inflection point of the perfusion curve preceding the establishment of the minimum perfusion plateau.

Figure 2 -Tempo para a Oclusão Efetiva (TO) nos diferentes membros. Intervalo temporal (média $\pm$ SEM) correspondente à fase transitória inicial da oclusão, compreendido entre o início da diminuição abrupta da perfusão e o ponto de inflexão da curva de perfusão que antecede o estabelecimento do patamar mínimo.

Discussion

In this study, we sought to understand how the changes — likely of neural origin — observed in the ipsilateral hand during the PORH protocol were reproduced in more distal sites, such as the contralateral hand and the feet. At the same time, we aimed to improve our analytical approach by considering the role of temporal segmentation in identifying spatially distributed responses within a phase-specific analytical framework, thereby avoiding comparisons based on extended time intervals, such as those used in conventional analysis.

Conventional time-averaged analysis revealed significant perfusion changes exclusively in the occluded limb during phase 2 (Table 2) and during the immediate reperfusion phase (first minute). Following these changes, a progressive return to baseline values occurred throughout the immediate (second minute) and late reperfusion phases. Using this approach, no other statistically significant changes were detected in the contralateral hand or in the lower limbs. From this perspective, PORH could be interpreted as a predominantly local response with limited sensitivity (7,8,25–27).

Phase-specific analysis, however, highlighted the occlusion phase, which is often overlooked in mechanistic evaluations of PORH. Indeed, our research has highlighted the importance of occlusion as the trigger for the entire mechanism (26,27). Our data indicate that occlusion of this major vessel induces intense vasoconstriction, likely of autonomic (sympathetic) origin, which appears proportional to the stimulus and is therefore more pronounced in the occluded limb, where it persists throughout phase 2. To reinforce the relevance of this event, a temporal parameter — the time to effective occlusion (TO) — was proposed to quantify the effectiveness of this reflex. As shown in Figure 2, TO was detectable in all limbs and exhibited similar intervals across sites. However, in the limb undergoing the PORH maneuver, a complete absence of flow was not observed due to Brownian motion of interstitial macromolecules, red blood cell rheology, and differing sensitivities of measurement instruments (10,28,29).

Regarding the reperfusion period following cuff deflation, phase-specific analysis focused on detecting local changes occurring over shorter time intervals. In the ipsilateral limb, these changes manifested as increased perfusion culminating in a hyperemic peak

Discussão

Neste estudo procurámos entender de que forma as alterações, provavelmente de carácter neuronal, observadas na mão ipsilateral durante o protocolo de PORH foram reproduzidas em locais mais distais, como a mão contralateral e os pés. Ao mesmo tempo, procurámos melhorar a nossa análise considerando o papel da segmentação temporal na identificação de respostas espacialmente distribuídas – abordagem analítica específica por fases, evitando comparações com base em intervalos temporais extensos, tais como os usados na análise convencional.

A análise baseada na média temporal convencional revelou alterações significativas da perfusão exclusivamente no membro ocluído durante a fase 2 (Tabela 2) e na fase de reperfusão imediata (primeiro minuto). Após estas alterações ocorre um retorno progressivo aos valores basais ao longo da fase de reperfusão imediata (segundo minuto) e tardia. Com esta abordagem, não foram detetadas outras alterações estatisticamente significativas na mão contralateral nem nos membros inferiores. Nesta perspetiva poderia ser interpretado como uma resposta predominantemente local com sensibilidade limitada (7,8,25–27).

A análise específica por fases permitiu chamar a atenção para a fase de oclusão normalmente não considerada na avaliação mecanística da PORH. Efetivamente, a nossa investigação tem sublinhado a importância da oclusão como gatilho de todo o mecanismo (26,27). Os nossos dados apontam para que a oclusão deste vaso principal desencadeia uma intensa vasoconstrição, provavelmente de natureza autonómica (simpática) que parece ser proporcional ao estímulo, mais visível, portanto, no membro ocluído, onde está presente durante toda a fase 2. Para reforçar a importância deste evento, é proposto um parâmetro temporal que permite quantificar a efetividade deste reflexo – TO. Como demonstramos (Figura 2) este é detetável em todos os membros e com intervalos semelhantes entre si. No entanto, no membro onde se efetua a manobra de PORH não se regista uma ausência total de fluxo devido ao movimento browniano de macromoléculas intersticiais, à reologia dos glóbulos vermelhos e às diferentes sensibilidades dos instrumentos de medição (10,28,29).

No que respeita ao período de reperfusão que se segue à abertura da manga, a análise específica por fases concentra-se na procura de alterações locais detetadas em intervalos de tempo mais curtos e que no membro ipsilateral se manifestam num aumento

during the first minute after cuff release (9,10,25). Statistical analysis of early reperfusion was not based on point maximum values due to high temporal and interindividual variability (30), but rather on comparisons between perfusion values obtained in discrete temporal intervals and the mean perfusion recorded during effective occlusion, 30 seconds after TO (Table 3). With the exception of the contralateral upper limb, all analyzed sites exhibited significant increases in perfusion relative to effective occlusion, reflecting a rapid vascular response to pressure release, consistent with reflex-mediated modulation of vasomotor tone.

Taken together, these data support the interpretation of PORH as an integrative phenomenon primarily involving reflex mechanisms of vasomotor regulation mediated by the autonomic nervous system, which manifest synchronously across multiple peripheral regions. In this context, TO may, for the first time, represent a measure of the adaptive efficiency of the sympathetic response in the peripheral circulation as a trigger of the entire process and may therefore be amenable to further quantification (e.g., synchrony). Similarly, measurement of rapid reperfusion may complement information regarding the neural reflex, while subsequent slower and more sustained events (although dependent on this initial reperfusion) suggest the involvement of other local adaptive processes previously described (7,25,26,27,31,32). The use of long temporal averages (conventional analysis) may obscure rapid transient changes occurring in response to external pressure variations. Phase-specific analysis, by increasing temporal resolution, allows identification of perfusion changes that would otherwise remain undetected.

In summary, the present results support a phase-dependent interpretation of PORH and suggest the use of high-resolution measurements. This perspective is consistent with recent evidence indicating that PORH does not solely represent a direct assessment of endothelial function, but rather reflects the integrated contribution of multiple regulatory mechanisms (31,32).

Despite its exploratory nature, the present study has several limitations that should be considered when interpreting the results. First, the small sample size limits the generalizability of the findings to the broader population. Additionally, the participants (young and healthy individuals) do not represent the general

de perfusão, culminando num pico de hiperémia, que tem lugar no primeiro minuto após deflação da manga (9,10,25). A análise estatística da reperfusão precoce não foi baseada em valores máximos pontuais, devido a uma elevada variabilidade temporal e interindividual (30), mas sim na comparação da perfusão obtida em intervalos temporais discretos com a perfusão média registada durante o período de oclusão efetiva, 30 segundos após o TO (Tabela 3). Com exceção do membro superior contralateral, todos os locais analisados apresentaram aumentos significativos da perfusão relativamente à oclusão efetiva, refletindo uma resposta vascular rápida à libertação da pressão, compatível com mecanismos reflexos de modulação do tónus vasomotor.

No seu conjunto, estes dados sustentam a interpretação da PORH como um fenómeno integrativo, envolvendo primariamente mecanismos reflexos de regulação vasomotora, mediados pelo sistema nervoso autónomo, que se manifestam de forma sincronizada em múltiplas regiões periféricas. Neste contexto, o TO poderá introduzir pela primeira vez uma medição sobre a eficiência adaptativa da resposta simpática na circulação periférica como gatilho de todo o processo, portanto, aberto a outras quantificações (sincronia, por exemplo). No mesmo sentido, a medição da reperfusão rápida pode vir a complementar a informação sobre o reflexo neural, enquanto os eventos ulteriores, mais lentos e duradouros (embora dependentes desta reperfusão inicial), sugerem o envolvimento de outros processos adaptativos locais já abordados anteriormente (7,25,26,27,31,32). A utilização de médias temporais longas (análise convencional) poderá ocultar alterações transitórias rápidas que ocorrem em resposta a mudanças de pressão externa. A análise específica por fases, ao aumentar a resolução temporal, permite identificar essas alterações da perfusão que, de outro modo, passariam despercebidas.

Em síntese, os presentes resultados sustentam, na PORH, uma interpretação igualmente dependente de fase, mas sugerem a utilização de medições de elevada resolução. Esta perspetiva é consistente com evidências recentes que indicam que a PORH não constitui apenas uma avaliação direta da função endotelial, refletindo antes a contribuição integrada de múltiplos mecanismos reguladores (31,32).

Apesar do seu carácter exploratório, o presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na avaliação dos resultados. Desde logo a reduzida dimensão da amostra limita a extensão dos achados à população geral. Por outro lado, os participantes (jovens saudáveis) não representam a população geral nem permitem o estudo de outras

population and do not allow evaluation of other relevant variables such as age and sex. Nevertheless, the observed responses are supported by a robust methodology that the authors have applied across multiple experimental contexts. For this reason, the results are considered relevant and justify expansion of the sample size and potential validation in clinical settings.

Conclusion

Multisite assessment with high temporal resolution provides a broader understanding of the adaptive events associated with PORH and cardiocirculatory homeostasis. Furthermore, it enables identification of new temporal variables related to the autonomic component of the PORH reflex, in line with the need to identify additional parameters that may enhance the clinical applicability of PORH.

Funding

This work was funded by COFAC and ALIES, management entities of CBIOS, and by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through funding UIDB/04567/2025 (<https://doi.org/10.54499/UID/04567/2025>).

Author contributions

All authors contributed equally to the manuscript as presented in its final version.

Acknowledgements

The authors thank all participants and Clemente Rocha for the support provided during the development of this work.

Conflict of interest

The editors involved in the authorship of this manuscript did not participate in the review process or in editorial decision-making. The authors declare that there are no financial or personal relationships that could be interpreted as potential conflicts of interest.

variáveis relevantes como sejam a idade e o sexo. Contudo, as respostas obtidas estão suportadas por uma metodologia robusta, amplamente aplicada pelos autores em diversos contextos experimentais. Por essa razão os resultados são considerados como relevantes justificando o alargamento da amostra e a sua potencial validação em contextos clínicos.

Conclusão

A avaliação multilocal com elevada resolução temporal proporciona uma compreensão mais alargada dos acontecimentos adaptativos associados à PORH e à homeostasia cardiocirculatória. Adicionalmente, permite identificar novas variáveis temporais relacionadas com a componente autonómica do reflexo de PORH, em consonância com a necessidade de encontrar outras variáveis que melhorem o potencial de aplicação clínica da PORH.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela COFAC e pela ALIES entidades de gestão do CBIOS e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do financiamento UIDB/04567/2025 (<https://doi.org/10.54499/UID/04567/2025>).

Contributo dos autores

Todos os autores contribuíram de forma equitativa para o manuscrito, tal como apresentado na sua versão final.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todos os participantes e a Clemente Rocha pelo apoio oferecido durante o desenvolvimento deste trabalho.

Conflito de interesses

Os editores envolvidos na autoria deste manuscrito não participaram no processo de revisão nem na tomada de decisão editorial. Os autores declaram não existirem quaisquer relações financeiras ou pessoais que possam ser interpretadas como potenciais conflitos de interesse.

References / Referências

1. Eleftheriadou, V., & Thompson, A. R. (2023). Skin is a window to one's inner world. *British Journal of Dermatology*, 189(5), 501–502. <https://doi.org/10.1093/bjd/ljad300>
2. Lozzi F., Camera, E., Cardinali, G., & Di Nardo, A. (2025). Exploring the skin as an open window onto neurodegenerative diseases. *Translational Neurodegeneration*, 14(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40035-025-00522-4>
3. Serup, J. (1995). Bioengineering and the skin: Standardization. *Clinics in Dermatology*, 13(4), 293–297. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(95\)00077-S](https://doi.org/10.1016/0738-081X(95)00077-S)
4. Zuang, V., & Berardesca, E. (1998). Designing and performing clinical studies with bioengineering techniques. *Current Problems in Dermatology*, 26, 209–216. <https://doi.org/10.1159/000060564>
5. Rodrigues, D., Barbosa, A. I., Rebelo, R., Kwon, I. K., Reis, R. L., & Corrello, V. M. (2020). Skin-integrated wearable systems and implantable biosensors: A comprehensive review. *Biosensors*, 10(7), 79. <https://doi.org/10.3390/bios10070079>
6. Yuan, Y., Zhong, B., Qin, X., et al. (2025). An epidermal serine sensing system for skin healthcare. *Nature Communications*, 16, 2681. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58147-0>
7. Roustit, M., & Cracowski, J.-L. (2012). Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: An insight into methods. *Microcirculation*, 19(1), 47–64. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x>
8. Sun, Y., & Thakor, N. (2016). Photoplethysmography revisited: From contact to noncontact, from point to imaging. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 63(3), 463–477. <https://doi.org/10.1109/TBME.2015.2476337>
9. Coccarelli, A., & Nelson, M. D. (2023). Modeling reactive hyperemia to better understand and assess microvascular function: A review of techniques. *Annals of Biomedical Engineering*, 51(3), 479–492. <https://doi.org/10.1007/s10439-022-03134-5>
10. Shirazi, B. R., Valentine, R. J., & Lang, J. (2021). Reproducibility and normalization of reactive hyperemia using laser speckle contrast imaging. *PLOS ONE*, 16(1), e0244795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244795>
11. Yaqub, M. A., Zanoletti, M., Cortese, L., Sánchez, D., Amendola, C., Frabasile, L., & Durduran, T. (2024). Non-invasive monitoring of microvascular oxygenation and reactive hyperemia using hybrid near-infrared diffuse optical spectroscopy for critical care. *Journal of Visualized Experiments*, 207, e66062. <https://doi.org/10.3791/66062>
12. Desanlis, J., Gordon, D., French, C., Calveyrac, C., Cottin, F., & Gernigon, M. (2024). Effects of occlusion pressure on hemodynamic responses recorded by near-infrared spectroscopy across two visits. *Frontiers in Physiology*, 15, 1441239. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1441239>
13. Kim, J., Franke, W. D., & Lang, J. (2022). Delayed cutaneous microvascular responses with non-consecutive 3 days of remote ischemic preconditioning. *Frontiers in Physiology*, 13, 852966. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.852966>
14. Heaps, C. L., Robles, J. C., Sarin, V., Mattox, M. L., & Parker, J. (2014). Exercise training-induced adaptations in mediators of sustained endothelium-dependent coronary artery relaxation in a porcine model of ischemic heart disease. *Microcirculation*, 21(5), 388–400. <https://doi.org/10.1111/micc.12116>
15. Zelikovski, A., Loberman, Z., Rauh, G., & Breu, F. (2014). Efficacy and safety of a new pneumatic compression device for peripheral arterial disease with intermittent claudication. *Phlebologie*, 43(1), 5–11. <https://doi.org/10.12687/phleb2184-01-2014>
16. Delis, K. T., & Knaggs, A. L. (2005). Duration and amplitude decay of acute arterial leg inflow enhancement with intermittent pneumatic leg compression: An insight into the implicated physiologic mechanisms. *Journal of Vascular Surgery*, 42(4), 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.06.004>
17. Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Ferreira, H. T., & Silva, H. N. (2020). Lower limb massage in humans increases local perfusion and impacts systemic hemodynamics. *Journal of Applied Physiology*, 128(5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00437.2019>
18. Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Andrade, S., Granja, T., & Gregório, J. (2023). The acute adaptation of skin microcirculatory perfusion in vivo does not involve a local response but rather a centrally mediated adaptive reflex. *Frontiers in Physiology*, 14, 1177583. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1177583>
19. Silva, H., Ferreira, H. A., Renault, M. A., Silva, H. P., & Rodrigues, L. M. (2018). The venoarteriolar reflex significantly reduces contralateral perfusion as part of the lower limb circulatory homeostasis in vivo. *Frontiers in Physiology*, 9, 1123. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01123>
20. McDowell, J., Addington, G., Metzler-Wilson, K., & Wilson, T. E. (2024). Autonomic responses to cold pain: Effect of type, duration, and habituation in cryotherapy. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 57(4), 832–839. <https://doi.org/10.1249/MSS.00000000000003620>
21. Barath, S., Langrish, J. P., Lundbäck, M., Bosson, J. A., Goudie, C., Newby, D. E., & Blomberg, A. (2013). Short-term exposure to ozone does not impair vascular function or affect heart rate variability in healthy young men. *Toxicological Sciences*, 135(2), 292–299. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft157>
22. Florindo, M., Nuno, S., & Rodrigues, L. (2022). Lower limb dynamic activity significantly reduces foot skin perfusion: Exploring data with different optical sensors in age-grouped healthy adults. *Skin Pharmacology and Physiology*, 35(1), 13–22. <https://doi.org/10.1159/000517906>
23. World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
24. Krishnan, A., Lucassen, E., Hogeman, C., Blaha, C., & Leuenberger, U. (2011). Effects of limb posture on reactive hyperemia. *European Journal of Applied Physiology*, 111(7), 1415–1420. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1769-z>
25. Cracowski, J.-L., & Roustit, M. (2020). Human skin microcirculation. *Comprehensive Physiology*, 10(3), 1105–1154. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190008>
26. Rodrigues, L., Rocha, C., Ferreira, H., & Andrade, S. (2024). Endothelial function cannot be assessed by the reactive hyperemia following occlusion. *Physiology*, 39(Suppl. 1), 936. <https://doi.org/10.1152/physiol.2024.39.s1.936>
27. Nicolai, M., Caetano, J., Silva, E., Rocha, C., Alves, J. D., & Monteiro Rodrigues, L. (2025). Reactive hyperemia: Looking for mechanistic

- reasonings in glabrous and non-glabrous skin. In Book of Abstracts of the 2025 National Portuguese Physiology Society Congress (*Biomedicine & Biopharmaceutical Research*, 22 (2), Abstract U3.24). <https://doi.org/10.19277/bbr.22.2.365>
28. Wahlberg, E., Olofsson, P., Swedenborg, J., & Fagrell, B. (1992). Effects of local hyperemia and edema on the biological zero in laser Doppler fluxmetry. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental*, 11(2), 157–165.
 29. Wahlberg, E., Olofsson, P., Swedenborg, J., & Fagrell, B. (1995). Changes in postocclusive reactive hyperaemic values as measured with laser Doppler fluxmetry after infrainguinal arterial reconstructions. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 9(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S1078-5884\(05\)80090-5](https://doi.org/10.1016/S1078-5884(05)80090-5)
 30. Rosenberry, R., & Nelson, M. D. (2020). Reactive hyperemia: A review of methods, mechanisms, and considerations. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 318(4), R605–R618. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00339.2019>
 31. Navedo, M. F., Earley, S., & Isakson, B. E. (2025). Understanding vascular reactivity. *Microcirculation*, 32(3), e70008. <https://doi.org/10.1111/micc.70008>
 32. Tarasov, A. P., Karpov, V. N., & Rogatkin, D. A. (2025). Evaluation model of microhemodynamics in finger skin at arterial occlusion and post-occlusive hyperemia. *Fluids*, 10(12), 314. <https://doi.org/10.3390/fluids10120314>