

## Comparative view of reactive hyperemia perfusion changes in the upper-limb by laser Doppler flowmetry and optoacoustic tomography

### Comparação das altera es de perfusão após hiperémia reactiva no membro superior avaliadas por Fluxometria de Laser Doppler e por Tomografia Fotoacústica

Sérgio Faloni de Andrade , Tiago Granja , Luís Monteiro Rodrigues  

**Keywords:** OAT, LDF, reactive hyperemia, PORH

**Palavras-chave:** OAT, LDF, hiperemia reactiva, PORH

#### To Cite:

Faloni de Andrade, S., Granja, T., & Monteiro Rodrigues L. (2023) Comparative view of reactive hyperemia perfusion changes in the upper-limb by laser Doppler flowmetry and optoacoustic tomography and meta-analysis *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 1-10.

 [10.19277/bbr.20.1.304](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.304)

CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lus fona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

Correspondence to / Correspond ncia a:  
[monteiro.rodrigues@ulusofona.pt](mailto:monteiro.rodrigues@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 10/03/2023  
Accepted / Aceite: 14/04/2023

#### Abstract

Laser Doppler flowmetry (LDF) is one of the most used technologies to access human in vivo blood perfusion. However, its single point measurement capacity in a depth that likely is lower than 1 mm, are major criticisms that limit its utility. New image-based techniques such as Optoacoustic Tomography (OAT) allow the non-invasive observation of larger tissue areas with greater spatial resolution. In this study, we compared synchronized LDF and OAT data during a Post-Occlusion Reactive Hyperemia (PORH) maneuver in the upper limb (occlusion of the brachial artery). Measurements were obtained in the volar forearm (OAT and LDF) and in the fingertip (LDF). All procedures respected the principles of good clinical practices for human research purposes. Results confirm that LDF and OAT signals are significantly correlated at the superficial plexus. LDF does not detect deeper vascular structures of the skin but, even so, it is still very useful to access perfusion in areas with higher capillary density such as the fingertip.

#### Resumo

A fluxometria de laser Doppler (LDF)   uma das tecnologias mais utilizadas para medir a perfusão sanguínea humana in vivo. No entanto, s o conhecidas importantes limita es desta técnica pois a medi o está limitada a um ponto único na pele numa reduzida profundidade (provavelmente inferior a 1 mm). Tecnologias mais recentes baseadas em imagem, como a Tomografia Fotoacústica (OAT), permitem a observa o não invasiva de áreas de tecido mais alargadas, com maior resolu o espacial. Neste estudo, comparámos dados de LDF e OAT sincronizados durante uma manobra de Hiperemia Reactiva de Pós-Oclusão (PORH) suprasist lica (artéria braquial) no membro superior. As medi es foram obtidas na parte ventral do antebraço (OAT e LDF) e na ponta do dedo (LDF). Todos os procedimentos respeitaram os princípios de boas práticas clínicas para fins de investiga o em humanos. Os resultados confirmam que os sinais LDF e OAT estão significativamente correlacionados no plexo superficial. O LDF não detecta estruturas vasculares mais profundas da pele mas, mesmo assim, ainda   muito útil para aceder   perfusão em áreas com maior densidade capilar, tais como acontece na ponta do dedo.

## Introduction

The ability of tissues to control their own local blood flow in proportion to their metabolic needs is one of the fundamental principles of circulatory function (1). A clear example of this mechanism is observed in skeletal muscle during exercise, a situation in which blood flow can dramatically exceed resting values (2,3). Adequate hemodynamics depends on an integrated complex process involving multiple sensors and effectors (4) and this includes a permanent adaptation between macrocirculation and microcirculation (5). Disturbance in these basic mechanisms might over-compensate adaptation, leading to disease (6).

Microcirculatory impairment seems to be in the origin of well known conditions such as hypertension, stroke, peripheral artery disease, among others (7, 8). However, these events do not occur independently and, ultimately will affect all components of the cardiovascular system (4). This justifies the continued interest in cardiovascular physiology and in microcirculation specifically, to find better, more descriptive markers with clinical relevance, enabling early diagnostic and better disease prevention (9, 10).

The study of human microcirculation *in vivo* has been at the origin of a wide variety of non-invasive instruments designed to quantitatively describe the individual's vascular status, primarily exploring skin microcirculation (11,12). Some recent reviews have been published on this subject, showing laser Doppler flowmetry (LDF) as one of the most referenced technologies accessing microcirculation function (13,14). However, this optical-based technology provides tissue perfusion only on a single-point acquisition area of the skin at fixed depth, depending on the frequency of the laser light (15,16). Currently, new technologies are able to associate image quantification with biological markers, providing a wider view of the vascular physiology. Among these technologies are confocal microscopy and optical coherence tomography or, more recently, of photoacoustic tomography (OAT) (17-19). However high cost and complex operation limit their applicability.

## Introdução

A capacidade dos tecidos controlarem o seu próprio fluxo sanguíneo local proporcionalmente às suas necessidades metabólicas é um dos princípios fundamentais da função circulatória (1). Um exemplo claro desse mecanismo é observado no músculo esquelético durante o exercício físico, situação em que o fluxo sanguíneo pode exceder, dramaticamente, os valores de repouso (2,3). Uma hemodinâmica adequada depende de um processo integrado, complexo, envolvendo múltiplos sensores e efetores (4). Tal envolve uma adaptação permanente entre a macrocirculação e a microcirculação (5). A alteração desses mecanismos pode comprometer a adaptação, levando à doença (6).

O comprometimento da microcirculação parece estar na origem de condições bem conhecidas como a hipertensão, o acidente vascular cerebral, a doença arterial periférica, entre outras (7,8). No entanto, esses eventos não ocorrem de forma independente e, em última análise, afetarão todos os componentes do sistema cardiovascular (4). Isso justifica o contínuo interesse pela fisiologia cardiovascular e especificamente pela microcirculação, para encontrar marcadores melhores, mais descritivos e com relevância clínica, para permitir o diagnóstico precoce e uma melhor prevenção da doença (9,10).

O estudo da microcirculação humana *in vivo* deu origem a uma grande variedade de instrumentos não invasivos concebidos para descrever quantitativamente o estado vascular do indivíduo, explorando principalmente a microcirculação da pele (11,12). Algumas revisões recentes foram publicadas sobre o assunto, apontando a fluxometria laser Doppler (LDF) como uma das tecnologias mais usadas para acessar a função microcirculatória (13,14). No entanto, esta tecnologia de base óptica, apenas fornece perfusão do tecido numa área de aquisição de ponto único numa profundidade fixa, dependendo da frequência da luz do laser (15,16). Actualmente, as novas tecnologias permitem associar a quantificação de imagens a marcadores biológicos, proporcionando uma visão mais ampla da fisiologia vascular. Entre estas tecnologias contam-se a microscopia confocal e a tomografia de coerência óptica ou, mais recentemente, a tomografia optoacústica (também referida como fotoacústica) (OAT ou PAT) (17-19). No entanto, o alto custo e a complexa operação limitam sua aplicabilidade.

In the present paper we explore the *in vivo* cardiovascular responses obtained after a supra-systolic reactive hyperemia (PORH) applied in the upper arm, registered by LDF and OAT. The goal was to identify the major differences between the two optical-based technologies and, at the same time, to contribute to better understand the mechanisms of microcirculation adaptation involved in this experimental maneuver.

## Materials and Methods

### Recruited Volunteers

This work was developed with three female healthy participants (n=3) with a mean age of  $21.67 \pm 1.15$  years, a mean body mass of  $50.67 \pm 3.79$  kg and a mean body mass index (BMI) of  $19.61 \pm 2.18$  kg/m<sup>2</sup>. Data related to the participants' physiology are presented in Table 1. All procedures followed the principles of the Helsinki Declaration for good clinical practice and were previously approved by the Institutional Ethics Committee (Process CE.ECTS/P10.21). In brief, the selection of participants followed specific inclusion / non-inclusion criteria after informed written consent. Participants were non-smokers and free of any medication or food supplementation.

No presente artigo exploramos as respostas cardiovasculares obtidas *in vivo* após uma hiperemia reactiva supra-sistólica (PORH) aplicada na parte superior do braço, e registada por LDF e OAT. O objetivo foi identificar as principais diferenças entre as duas tecnologias de base óptica e, ao mesmo tempo, contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos de adaptação da microcirculação envolvidos nessa manobra experimental.

## Materiais e métodos

### Voluntários Recrutados

O trabalho foi desenvolvido com três participantes saudáveis do sexo feminino (n=3) com idade, massa corporal e índice de massa corporal (IMC) semelhantes. Os dados relativos à fisiologia dos participantes são apresentados na Tabela 1. Todos os procedimentos seguiram os princípios da Declaração de Helsinquia para as boas práticas clínicas e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Processo CE.ECTS/P10.21). Em suma, a seleção dos participantes obedeceu a critérios específicos de inclusão/não inclusão após consentimento informado por escrito. Os participantes eram não fumantes e não tomavam qualquer medicação ou suplementação alimentar.

**Table 1** - Biometric characterization of volunteers. Body Mass Index (BMI), Ankle Brachial Index (ABI), arbitrary units (a.u.), Systolic blood pressure (Syst BP), Diastolic blood pressure (Diast BP), heart rate (HR). Values are expressed as Mean  $\pm$  SD. /

**Tabela 1** - Caracterização biométrica dos voluntários. Índice de Massa Corporal (IMC), Índice Tornozelo-Braquial (ITB), Unidades Arbitrárias (u.a.); Pressão Arterial Sistólica (PA Sistólica), Pressão Arterial Diastólica (PA Diast), Ritmo Cardíaco (FC). Valores são expressos como Média  $\pm$  DV.

Age / Idade	$21.67 \pm 1.15$	years / anos
Body mass / Massa corporal	$50.67 \pm 3.79$	kg
Height / Altura	$1.61 \pm 0.06$	m
BMI / IMC	$19.61 \pm 2.18$	kg/m <sup>2</sup>
ABI / ITB	$0.52 \pm 0.08$	(a.u. / u.a.)
Systolic BP / PA Sistólica	$113.33 \pm 11.37$	mmHg
Diastolic BP / PA Diastólica	$84.67 \pm 14.15$	mmHg
Heart Rate / Ritmo Cardíaco	$71.00 \pm 19.05$	bpm

### Experimental

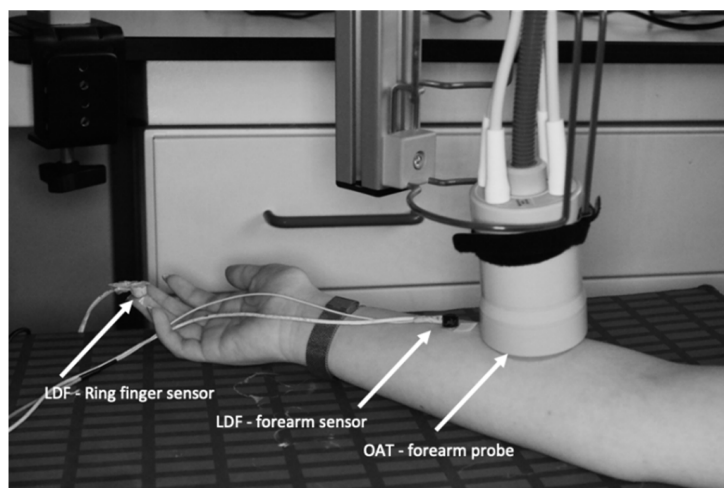
A post-occlusive reactive hyperemia (PORH) was used as a challenger. A pressure cuff was applied to the volunteers' brachial upper arm area prior to the installation of LDF and OAT probes. Participants were brought to resting conditions accessed by heart rate and temperature stabilization to the laboratory environment. The OAT probe was placed at the ventral forearm area, previously described (15). Two LDF probes were equally placed on the same limb - one next to the OAT probe and the other LDF sensor fixed to the ventral aspect of the third finger on the same side (Figure 1). The PORH maneuver was recorded simultaneously in continuous mode in both OAT and LDF technologies over the course of four different stages, resting baseline, cuff inflation to 200 mmHg, occlusion, and recovery. The baseline was recorded for 1 min; the brachial cuff inflation to 200 mmHg was performed over 20 sec; occlusion was held for 1 min at 200 mmHg, and the post-occlusion recovery was recorded for 680 sec.

Perfusion was followed by PeriFlux System 5000 LDF (Perimed AB, Järfälla, Sweden), expressed in arbitrary units of perfusion (PU's), using a red light with 780 nm and by OAT, using an Acuity MSOT (Multispectral

### Experimental

A hiperemia reactiva pós-oclusiva (PORH) foi usada como *challenge*. Para isso, uma manga de pressão foi aplicada na região de um dos braços dos voluntários antes da aplicação das sondas de LDF e OAT. Os participantes foram colocados em condições de repouso até estabilização da frequência cardíaca e da temperatura no ambiente laboratorial. A sonda OAT foi posicionada na região ventral do antebraço, conforme previamente descrito (15). Duas sondas LDF foram colocadas igualmente no mesmo membro - uma próxima à sonda OAT e a outra fixada na face ventral do terceiro dedo do mesmo lado (Figura 1). A manobra PORH foi registrada simultaneamente em modo contínuo nas tecnologias OAT e LDF ao longo de quatro estágios diferentes, linha de base em repouso, insuflação do manguito até 200 mmHg, oclusão e recuperação. A linha de base foi registrada por 1 min; a insuflação do manguito até 200 mmHg foi realizada em 20 segundos; a oclusão foi mantida a 200 mmHg por 1 min e a recuperação pós-oclusão foi registrada por 680 seg.

A perfusão foi registrada por LDF e por OAT. O sinal de LDF (PeriFlux System 5000, Perimed AB, Järfälla, Suécia), expresso em unidades arbitrárias de perfusão (PU's), utiliza uma luz vermelha com 780 nm. A perfusão por OAT utilizou um sistema de



**Figure 1** - LDF sensors and OAT probe setting prior to the PORH maneuver. Two LDF sensors were placed at the volunteer's ring finger (digit 4) fingertip and in the anterior middle - forearm. The OAT probe was stabilized proximal to the LDF anterior forearm sensor, fixed to a hinged support. The PORH manoeuvre was performed in the same arm where the LDF sensors and OAT probe were placed.

**Figura 1.** Posição dos sensores LDF e da sonda OAT antes da manobra PORH. Um dos sensores LDF foi colocado na ponta do dedo anelar (dígito 4) do voluntário e outra na região anterior do antebraço médio. A sonda OAT foi colocada próxima ao sensor LDF do antebraço, fixada a um suporte articulado. A manobra PORH foi realizada no mesmo braço onde foram colocados os sensores LDF e a sonda OAT.



Optoacoustic Tomography) imaging system (iThera Medical GmbH, Munich, Germany). The OAT system, which produces laser excitation pulses of 9 ns at wavelengths from 680 nm to 980 nm, acquired HbO<sub>2</sub> and Hb chromophore spectra simultaneously for wavelengths ranging from 680 nm to 980 nm, projected as 3D images with a resolution depth of 1.5 cm<sup>3</sup>. Data reconstruction followed the manufacture protocol algorithms (viewMSOT 4.0) after ROI analysis of Hb and HbO<sub>2</sub>, allowing the calculation of total hemoglobin (HbT) and mean O<sub>2</sub> saturation (MSOT SO<sub>2</sub>).

#### *Data analysis*

All graphical layouts were plot on GraphPad Prism 9.2.0 (283) MachineID: 0861F12DB8D10. Correlation analysis using Spearman's two-tailed test were applied to all variables.

### **Results and Discussion**

Exploratory tests such as the supra-systolic post-occlusive reactive hyperemia have been developed to assess local adaptive mechanisms to acute perfusion changes (17). Several proposed markers for microvascular disease (MVD) are related with the reactive perfusion response, however a wide variety of experimental conditions have been impaired proper data translation, limiting their utility (10,12,18). Nevertheless, mechanisms involved in microcirculatory adaptation to occlusion of a major vessel remains largely unknown. Recent results fail to support local reflex mechanisms (19,20) opening further research questions requiring interpretation.

Regarding assessment technologies, LDF provides information on blood perfusion velocity and volume at a relatively superficial depth (21,22). Considering the particular structure of skin microcirculation, we accept that LDF can access only a limited number of vessels and blood (13). Nevertheless, LDF has been extensively used as a gold standard to non-invasively monitor and evaluate local perfusion (23). Modern technologies such as OAT, with higher spatial and temporal resolutions, provide information on hemoglobin oxygenation (24-26). Spectroscopic

imagem Acuity MSOT (Multispectral Optoacoustic Tomography; iThera Medical GmbH, Munique, Alemanha). O sistema OAT, produz pulsos de excitação de laser de 9 ns em comprimentos de onda de 680 nm a 980 nm, que permite adquirir os espectros cromóforos da hemoglobina oxigenada (HbO<sub>2</sub>) e da hemoglobina desoxigenada (Hb) simultaneamente, projetados como imagens 3D com profundidade de resolução de 1,5 cm<sup>3</sup>. A reconstrução dos dados OAT seguiu os protocolos do fabricante (viewMSOT 4.0) após a análise de ROI para Hb e HbO<sub>2</sub> permitindo o cálculo de hemoglobina total (HbT) e da saturação média de O<sub>2</sub> (MSOT SO<sub>2</sub>).

#### *Análise de dados*

Todos os gráficos foram tratados pelo GraphPad Prism 9.2.0 (283) MachineID: 0861F12DB8D10. A análise de correlação usando o teste bicaudal de Spearman foi aplicada a todas as variáveis.

### **Resultados e discussão**

Testes exploratórios como a hiperémia reactiva pós-oclusiva supra-sistólica, foram desenvolvidos para avaliar os mecanismos adaptativos locais às alterações agudas de perfusão (17). Vários marcadores propostos para doença microvascular (MVD) estão relacionados com a resposta reactiva à perfusão, porém uma ampla variedade de condições experimentais tem prejudicado a tradução adequada dos dados, limitando a sua aplicabilidade (10,12,18). Contudo, os mecanismos envolvidos na adaptação microcirculatória à oclusão de um grande vaso permanecem amplamente desconhecidos. Resultados recentes parecem contrariar a ideia de envolverem mecanismos reflexos locais (19,20) abrindo outras direcções de investigação que requerem melhor interpretação.

No que respeita às tecnologias de avaliação, o LDF fornece informações sobre a velocidade e o volume da perfusão sanguínea numa profundidade relativamente superficial (21,22). Considerando a estrutura particular da microcirculação da pele, aceitamos que o LDF possa aceder a um número limitado de vasos (13). No entanto, o LDF tem sido amplamente utilizado como referencia para monitorar e avaliar de forma não invasiva a perfusão local (23). Tecnologias modernas como o OAT, com maior resolução espacial e temporal, fornecem informações sobre a oxigenação da hemoglobina (24-26). Tecnologias espectroscópicas

and tomographic technologies have been applied to study the impact of PORH in skin microvasculature (27-30) but synchronization limitations related to peak recovery time persists (30). We have recently highlighted that microcirculatory HbO<sub>2</sub> adjustment following PORH involves both micro and macrocirculation distributed at different tissue depths (23). Such reaction can only follow a centrally mediated response rather than a local reflex (4).

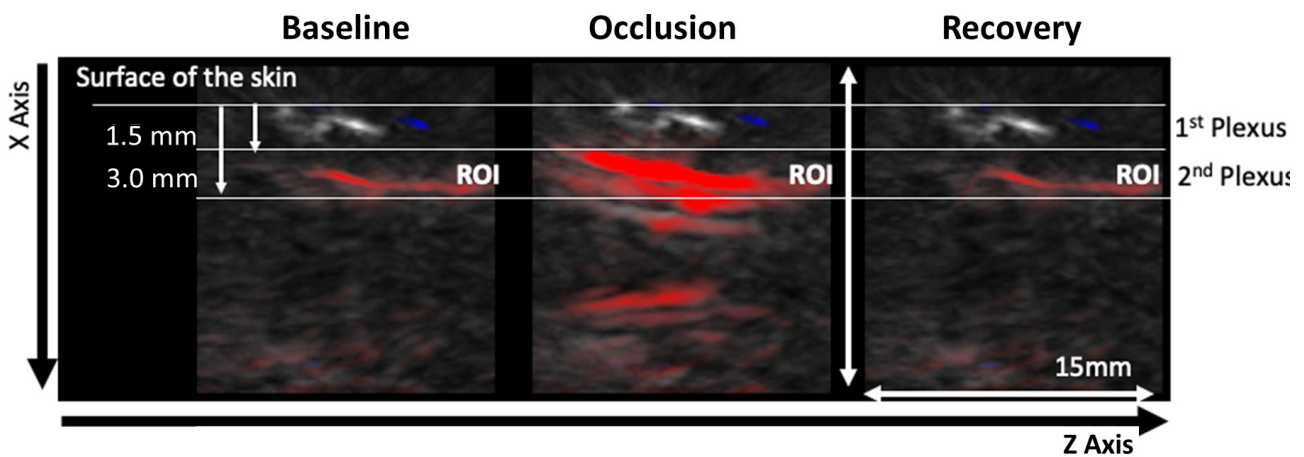
In the present study we explore the analytical performance of LDF and OAT under the same PORH experimental conditions (Figure 1 and Figure 2). Signals collected simultaneously with both systems were synchronized after data collection from all participants (Figure 3 and Figure 4).

The present experimental conditions allowed us to obtain the same perfusion profile with LDF at the volar forearm and at the fingertip with the latter being more prominent (Figure 3A). This effect is possible due to the dense microcirculation network present at the skin of the fingertip, compared with the forearm. This allows higher Doppler effect on single-point measurements, compared at the same

e tomográficas têm sido aplicadas para estudar o impacto da PORH na microvasculatura da pele (27-30), mas persistem limitações de sincronização relacionadas com o tempo de recuperação máximo (30). Recentemente salientámos que o ajuste da HbO<sub>2</sub> microcirculatória após a PORH envolve tanto a micro quanto a macrocirculação distribuída em diferentes profundidades teciduais (23). Essa reação só pode seguir uma resposta mediada centralmente, em vez de um reflexo local (4).

No presente estudo, exploramos o desempenho analítico do LDF e da OAT sujeitas às mesmas condições experimentais PORH (Figura 1 e Figura 2). Os sinais coletados simultaneamente com ambos os sistemas foram sincronizados após a coleta de dados de todos os participantes (Figura 3 e Figura 4).

Nestas condições obtivemos o mesmo perfil de perfusão LDF na parte ventral do antebraço e na ponta do dedo, apesar desta última mais proeminente (Figura 3A). Tal poderá dever-se à densa rede de microcirculatória da ponta do dedo, em comparação com o antebraço, permitindo um maior efeito Doppler em medições de ponto único, em comparação com



**Figure 2** - Representative OAT frames for data acquisition during the PORH protocol. The PORH maneuver involved three phases A) Baseline (60 sec); B) Occlusion at 200 mmHg (60 sec) with a brachial cuff; C) Post occlusive recovery (580 sec). Perfusion was recorded continuously. Videos of the skin microvasculature (axis XZ) show the impact of the challenger at the superficial plexus (1.5 mm deep) and at the deeper skin plexus (3.0 mm deep). The red colour represents the HbO<sub>2</sub> chromophore. /

**Figura 2** - Imagens representativas obtidas através de OAT durante a manobra de PORH. A manobra PORH envolveu três fases: A) Linha de base (60 seg.); B) Oclusão a 200 mmHg (60 seg.) com manguito braquial; C) Recuperação pós-oclusiva (580 seg.). A perfusão foi registada continuamente. Vídeos da microvasculatura da pele (eixo XZ) mostram o impacto da PORH no plexo superficial (1,5 mm de profundidade) e no plexo cutâneo mais profundo (3,0 mm de profundidade). A cor vermelha representa o cromóforo HbO<sub>2</sub>.

skin depth with the volar forearm (31-33). In fact, at the volar forearm skin, vascular structures are wider and the space between plexus longer, while they are much closer to each other at the fingertip (32).

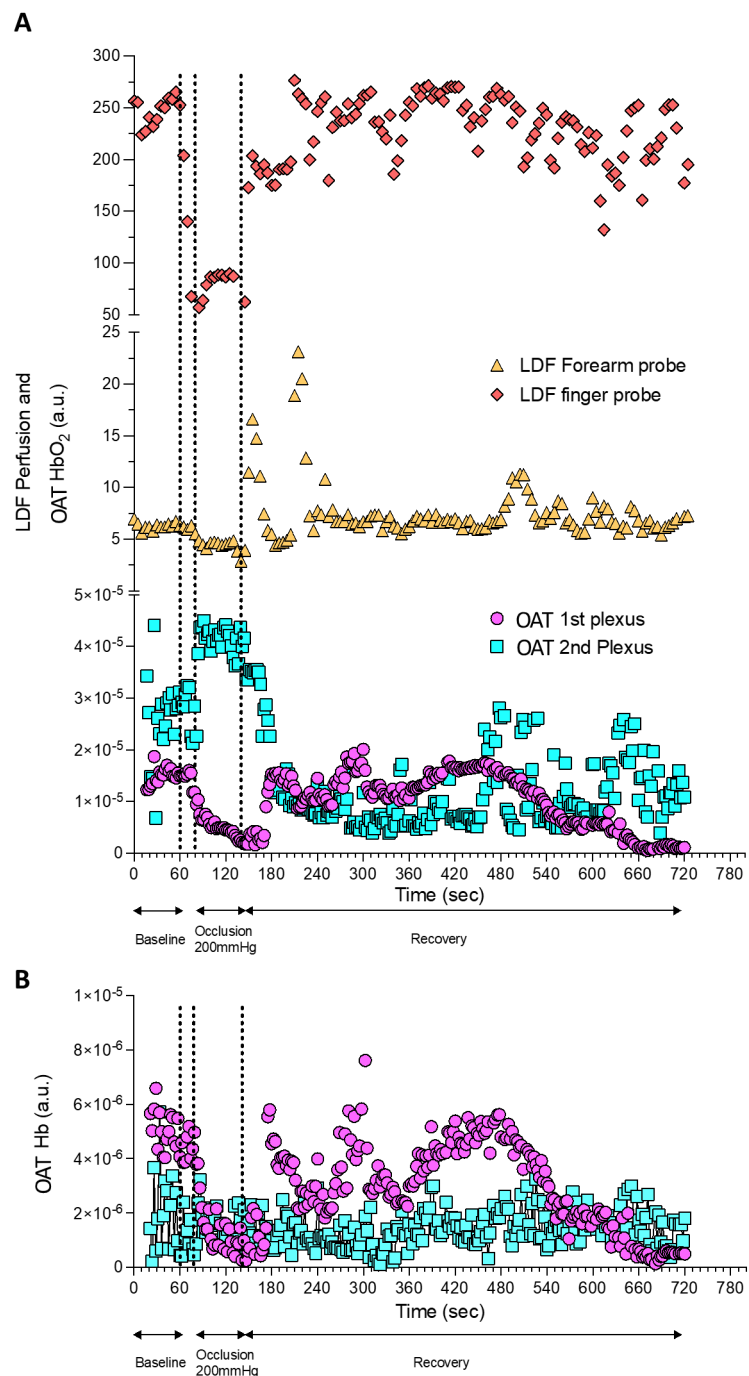
The PORH protocol involved a rapid reduction of tissue perfusion with the cuff occlusion (never reaching "zero"), followed by a rapid increase of perfusion of HbO<sub>2</sub> after the cuff deflation, reaching baseline values

a mesma profundidade da pele na região ventral do antebraço (31-33). De facto, na pele da região ventral do antebraço, as estruturas vasculares são mais largas e o espaço entre os plexos maior, enquanto na ponta dos dedos estão muito mais próximas umas das outras (32).

O protocolo PORH envolveu uma rápida redução da perfusão tecidual com a oclusão provocada pelo manga insuflada (nunca atingindo "zero"), seguida de um rápido aumento da perfusão de HbO<sub>2</sub> após

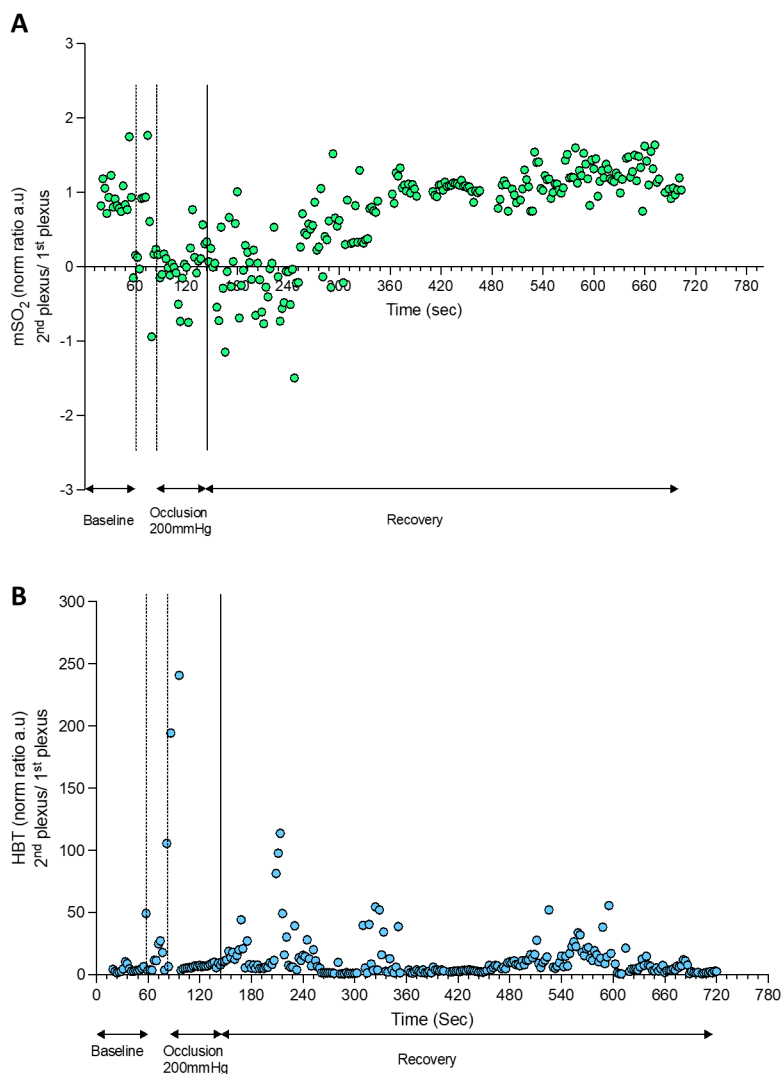
**Figure 3** - Perfusion changes detected by OAT and LDF during a PORH maneuver. OAT and LDF acquired signals were continuously synchronized during the PORH protocol.

**Figura 3** - Alterações de perfusão detectadas por OAT e LDF durante a manobra de PORH. Os sinais OAT e LDF adquiridos foram continuamente sincronizados durante o protocolo PORH.



during recovery. OAT offers much different spatial and temporal resolutions compared to LDF in a volume of 1.5 mm<sup>3</sup> (34). Therefore, through OAT we were able to identify both the superficial and the deeper skin plexus. Additionally, we can show that occlusion progressively provokes a HbO<sub>2</sub> perfusion decrease at the superficial plexus and an increase of HbO<sub>2</sub> at the deeper plexus, explained by blood transfer between plexus recently described (23,25).

a desinsuflação, atingindo valores basais durante a recuperação. O OAT oferece resoluções espaciais e temporais muito diferentes em comparação com o LDF num volume de 1,5 mm<sup>3</sup> (34). Portanto, por meio do OAT conseguimos identificar tanto o plexo cutâneo superficial, quanto o plexo cutâneo mais profundo. Adicionalmente, podemos mostrar que a oclusão provoca progressivamente uma diminuição da perfusão de HbO<sub>2</sub> no plexo superficial e um aumento da HbO<sub>2</sub> no plexo mais profundo, explicada pela transferência sanguínea entre estes plexos descrita recentemente (23,25).



**Figure 4** - HbT and mSO<sub>2</sub> calculated by OAT during a PORH maneuver.

**Figura 4** - HbT e mSO<sub>2</sub> calculados pelo OAT durante uma manobra de PORH.



The cuff deflation allowed recovery of HbO<sub>2</sub>, with restoration to baseline levels after 580 seconds. As perceived, the occlusion is taking place in the arm (brachial artery) and measurements are being obtained at the skin volar forearm and fingertip. Thus these responses are not local but rather mediated by a central / medullar reflex (4).

LDF and OAT technologies differ in terms of spatial resolution, tissue penetration depth, interaction between the light and the tissue and as a consequence, in the nature of the provided variables. Nevertheless, our correlation analysis found significant positive correlations between LDF signals registered in the fingertip and in the volar forearm, and between the fingertip LDF signal and the OAT superficial plexus signal.

In conclusion, this exploratory study confirms that both technologies have utility in measuring local as distal effects of forced circulatory changes, although much greater detail is available using OAT.

### **Funding**

This research is funded by ALIES and COFAC, the principal providers of the OAT technology, and by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through the grant UIDB/04567/2020 to CBFIOS.

### **Contribution of the authors**

All authors equally contributed to the manuscript as it shows in its final form.

### **Conflict of Interests**

Editors involved in this manuscripts' authorship had no participation in the review or decision process. All authors have stated that there are no financial and/or personal relationships that could represent a potential conflict of interest.

A desinsuflação do manguito permitiu a recuperação da HbO<sub>2</sub>, com retorno aos níveis basais após 580 segundos. Conforme descrito, a oclusão teve lugar no braço (artéria braquial) e as medidas foram obtidas na face volar do antebraço e na ponta do dedo. Estas respostas não são locais, mas sim mediadas por um reflexo central/medular (4).

As tecnologias LDF e OAT diferem em termos de resolução espacial, profundidade de penetração no tecido, interação entre a luz e o tecido e, conseqüentemente, na natureza das variáveis fornecidas. No entanto, nossa análise de correlação encontrou correlações positivas significativas entre os sinais LDF registados na ponta do dedo e na parte ventral do antebraço, e entre o sinal LDF da ponta do dedo e o sinal do plexo superficial no OAT.

Em conclusão, este estudo exploratório confirmou que ambas as tecnologias são úteis na medição dos efeitos locais e distais das alterações circulatórias forçadas, embora muito mais detalhes estejam disponíveis através do OAT.

### **Financiamento**

Esta pesquisa é financiada pela ALIES e COFAC, os principais provedores da tecnologia OAT, e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da bolsa UIDB/04567/2020 para o CBIOS.

### **Contribuição dos autores**

Todos os autores contribuíram igualmente para o manuscrito na sua forma final.

### **Conflito de interesses**

Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão ou decisão. Todos os autores declararam que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

## References / Referências

1. Hall, J. E. (2020). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (14th Edition ed.).
2. Segal, S. S. (1994). Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension*, 23(6 Pt 2), 1113-1120. doi:10.1161/01.hyp.23.6.1113
3. Trinity, J. D., Broxterman, R. M., & Richardson, R. S. (2016). Regulation of exercise blood flow: Role of free radicals. *Free radical biology & medicine*, 98, 90-102. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.017
4. Rodrigues, L. M., 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. doi:10.1152/jappphysiol.00437.2019
5. Climie, R. E., Gallo, A., Picone, D. S., Di Lascio, N., van Sloten, T. T., Guala, A., . . . Bruno, R. M. (2019). Measuring the Interaction Between the Macro- and Micro-Vasculature. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. doi:10.3389/fcvm.2019.00169
6. Lemaster, K., Jackson, D., Goldman, D., & Frisbee, J. C. (2017). Insidious incrementalism: The silent failure of the microcirculation with increasing peripheral vascular disease risk. *Microcirculation*, 24(2), e12332. doi:<https://doi.org/10.1111/micc.12332>
7. Senthilkumar, G., Gutierrez-Huerta, C. A., Freed, J. K., Beyer, A. M., Fancher, I. S., & LeBlanc, A. J. (2022). New developments in translational microcirculatory research. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 323(6), H1167-H1175. doi:10.1152/ajpheart.00566.2022
8. Chade, A. R. (2011). Renovascular disease, microcirculation, and the progression of renal injury: role of angiogenesis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300(4), R783-790. doi:10.1152/ajpregu.00657.2010
9. Clough G., & Cracowski, J.-L. (2012). Spotlight Issue: Microcirculation—From a Clinical Perspective. *Microcirculation*, 19(1), 1-4. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00142.x>
10. Glazkov, A. A., Krasulina, K. A., Glazkova, P. A., Kovaleva, Y. A., Bardeeva, J. N., & Kulikov, D. A. (2023). Skin microvascular reactivity in patients with diabetic retinopathy. *Microvascular Research*, 147, 104501. doi:10.1016/j.mvr.2023.104501
11. Abularrage, C. J., Sidawy, A. N., Aidinian, G., Singh, N., Weiswasser, J. M., & Arora, S. (2005). Evaluation of the microcirculation in vascular disease. *Journal of vascular surgery*, 42(3), 574-581. doi:10.1016/j.jvs.2005.05.019
12. Viridis, A., & Taddei, S. (2011). How to evaluate microvascular organ damage in hypertension: assessment of endothelial function. *High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension*, 18(4), 163-167. <https://doi.org/10.2165/11593630-00000000-00000>.
13. Humeau, A., Steenbergen, W., Nilsson, H., & Strömberg, T. (2007). Laser Doppler perfusion monitoring and imaging: novel approaches. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 45(5), 421-435. doi:10.1007/s11517-007-0170-5
14. Lal, C., & Leahy, M. J. (2016). An Updated Review of Methods and Advancements in Microvascular Blood Flow Imaging. *Microcirculation*, 23(5), 345-363. doi:<https://doi.org/10.1111/micc.12284>
15. Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G., & Steenbergen, W. (2009). Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in medical science*, 24(2), 269-283. doi:10.1007/s10103-007-0524-0
16. Fagrell, B., & Nilsson, G. (1995). Advantages and Limitations of One-Point Laser Doppler Perfusion Monitoring in Clinical Practice. *Vascular Medicine Review*, vnr-6(2), 97-101. doi:10.1177/1358863x9500600202
17. Roustit, M., & Cracowski, J. L. (2012). Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation*, 19(1), 47-64. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x
18. Yang, J., Zhang, G., Chang, W., Chi, Z., Shang, Q., Wu, M., . . . Jiang, H. (2020). Photoacoustic imaging of hemodynamic changes in forearm skeletal muscle during cuff occlusion. *Biomedical optics express*, 11(8), 4560-4570. <https://doi.org/10.1364/BOE.392221>
19. 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(3), R605-R618. doi:10.1152/ajpregu.00339.2019
20. Young, G. M., Krastins, D., Chang, D., Lam, J., Quah, J., Stanton, T., . . . Askew, C. D. (2021). The Association Between Contrast-Enhanced Ultrasound and Near-Infrared Spectroscopy-Derived Measures of Calf Muscle Microvascular Responsiveness in Older Adults. *Heart, Lung and Circulation*, 30(11), 1726-1733. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hlc.2021.07.004>
21. Bonner, R. F., & Nossal, R. (1990). Principles of Laser-Doppler Flowmetry. In A. P. Shepherd & P. Å. Öberg (Eds.), *Laser-Doppler Blood Flowmetry* (pp. 17-45). Boston, MA: Springer US.
22. Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G., & Steenbergen, W. (2009). Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers in Medical Science*, 24(2), 269-283. doi:10.1007/s10103-007-0524-0
23. Monteiro Rodrigues, L., Granja, T. F., & de Andrade, S. F. (2022). Optoacoustic Imaging Offers New Insights into In Vivo Human Skin Vascular Physiology. *Life*, 12(10), 1628. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/10/1628>
24. Hacker, L., Brunker, J., Smith, E. S. J., Quiros-Gonzalez, I., & Bohndiek, S. E. (2020). Photoacoustics resolves species-specific differences in hemoglobin concentration and oxygenation. *J Biomed Opt*, 25(9). doi:10.1117/1.Jbo.25.9.09500
25. Granja, T., Faloni de Andrade, S., & Rodrigues, L. M. (2022). Multispectral Optoacoustic Tomography for Functional Imaging in Vascular Research. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (184), 10.3791/63883. doi:10.3791/63883
26. Karlas, A., Fasoula, N.-A., Katsouli, N., Kallmayer, M., Sieber, S., Schmidt, S., . . . Ntziachristos, V. (2023). Skeletal muscle optoacoustics reveals patterns of circulatory function and oxygen metabolism during exercise. *Photoacoustics*, 30, 100468. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pacs.2023.100468>
27. Dennis, J. J., Wiggins, C. C., Smith, J. R., Isautier, J. M. J., Johnson, B. D., Joyner, M. J., & Cross, T. J. (2021). Measurement of muscle blood flow and O<sub>2</sub> uptake via near-infrared spectroscopy using a novel occlusion protocol. *Scientific Reports*, 11(1), 918. doi:10.1038/s41598-020-79741-w
28. McLay, K. M., Nederveen, J. P., Pogliaghi, S., Paterson, D. H., & Murias, J. M. (2016). Repeatability of vascular responsiveness measures derived from near-infrared spectroscopy. *Physiological Reports*, 4(9), e12772. doi:<https://doi.org/10.14814/phy2.12772>
29. Yang, J., Zhang, G., Chang, W., Chi, Z., Shang, Q., Wu, M., . . . Jiang, H. (2020). Photoacoustic imaging of hemodynamic changes in forearm skeletal muscle during cuff occlusion. *Biomedical Optics Express*, 11(8), 4560-4570. doi:10.1364/BOE.392221
30. Didier, K. D., Hammer, S. M., Alexander, A. M., Caldwell, J. T., Sutterfield, S. L., Smith, J. R., . . . Barstow, T. J. (2020). Microvascular blood flow during vascular occlusion tests assessed by diffuse correlation spectroscopy. *Experimental Physiology*, 105(1), 201-210. doi:<https://doi.org/10.1113/EP087866>
31. Tibiriçá, E., Matheus, A. S. M., Nunes, B., Sperandei, S., & Gomes, M. B. (2011). Repeatability of the evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser doppler perfusion monitoring: clinical and statistical implications. *Clinics*, 66(4), 599-605. doi:<https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000400013>
32. Roustit, M., Blaise, S., Millet, C., & Cracowski, J. L. (2010). Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry. *Microvascular Research*, 79(2), 102-108. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.01.001>
33. Pouratian, N., & Toga, A. W. (2002). 5 - Optical Imaging Based on Intrinsic Signals. In A. W. Toga & J. C. Mazziotta (Eds.), *Brain Mapping: The Methods (Second Edition)* (pp. 97-140). San Diego: Academic Press.
34. Tiago Granja, S. F. d. A., and Luis Monteiro Rodrigues. (2021). Optoacoustic Tomography – good news for microcirculatory research. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 18(2), 200-212. doi: 10.19277/bbr.18.2.269