

## Short duration – low intensity isometric plantar flexion increases distal perfusion: observations from a healthy cohort

*A flexão plantar isométrica de baixa intensidade e curta duração aumenta a perfusão distal: observações de uma coorte saudável*

Margarida Florindo<sup>1,2,3</sup>, João Gregório<sup>1</sup> & Luis Monteiro Rodrigues<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Lusófona CBIOS - Research Center for Biosciences and Health Technologies, Av Campo Grande, Lisboa, Portugal (EU); <sup>2</sup>U Alcalá PhD Program Health Sciences-Alcalá (Madrid) Spain ; <sup>3</sup>ESSCVP - the Portuguese Red Cross Health School. Dep. Physiotherapy | Lisboa, Portugal (EU)

\* corresponding author / autor para correspondência: monteiro.rodrigues@ulusofona.pt

---

### Abstract

Controlled physical activity might help as a preventive and therapeutic tool in vascular pathology. In this study we aimed to understand how lower limb exercise impacts perfusion in a healthy cohort. The study involved a convenience sample of eighteen previously selected healthy individuals of both sexes (n=9 each), mean age  $32.8 \pm 12.7$  years. Procedures respected all principles of good clinical practice. Blood perfusion changes were simultaneously assessed in the dorsal region of both feet by laser Doppler flowmetry (LDF) and polarised spectroscopy (PSP). Measurements were taken at baseline, after stabilization (phase I), following 1 minute of bipedal isometric plantar flexion (phase II), and during recovery (phase III). Descriptive and comparative statistics were performed. Plantar flexion evoked significant perfusion changes in both feet, but in opposite directions – increasing with LDF and decreasing with PSP. These changes indicate that this approach promotes an adaptive mobilisation of blood from superficial to the deeper plexus. No significant changes in arterial blood pressure or cardiac frequency were detected. This manoeuvre, needing no specialised supervision, is capable of promoting significant perfusion changes in the lower limb, showing potential to be further explored in future studies with a prospective design in a preventive/recovery context.

**Keywords:** plantar flexion, foot perfusion, laser Doppler flowmetry, polarised spectroscopy, PAHR - prompt adaptive hemodynamical response, physical activity, home-health

---

### Resumo

A atividade física controlada pode ser uma ferramenta preventiva e terapêutica na patologia vascular. Neste estudo, o objetivo foi entender como o exercício nos membros inferiores afeta a perfusão num grupo de indivíduos saudáveis. O estudo envolveu uma amostra de conveniência de dezoito indivíduos saudáveis, de ambos os sexos ( $32,8 \pm 12,7$  anos) previamente selecionados. Os procedimentos respeitaram todos os princípios da boa prática clínica. A perfusão sanguínea foi avaliada na região dorsal de ambos os pés por fluxometria de laser Doppler (LDF) e espectroscopia polarizada (PSP), após a estabilização basal (fase I), 1 minuto depois da flexão plantar isométrica bípede (fase II) e durante a recuperação (fase III). Foi efectuada análise estatística descritiva e comparativa. Foram detectadas alterações significativas em ambos os pés, em direções opostas – aumentando com LDF e diminuindo com PSP. Essas mudanças indicam que esta abordagem promove uma mobilização adaptativa do sangue do plexo superficial para o mais profundo. Não foram detectadas alterações significativas na pressão arterial ou na frequência cardíaca. Não necessitando de supervisão permanente, este exercício é capaz de promover alterações perfusionais significativas no membro inferior, mostrando potencial para ser explorado em estudos futuros com desenho prospectivo em contexto preventivo e de recuperação.

**Palavras-chave:** flexão plantar, perfusão do pé, fluxometria de laser Doppler, espectroscopia polarizada, RRAH - resposta rápida de adaptação hemodinâmica, atividade física, saúde em casa

## Introduction

Physical activity and controlled exercise are commonly regarded as indispensable components of well-being, as well as useful in the prevention (or slowing the progression) of disease and favoring recovery from both injury and disease (1,2), and both are seen as principal to provide the necessary cardio-respiratory and microcirculatory operations that ensure normal tissue “performance” (2-5). A precise balance involving structural integrity to respond to neuroendocrine output affecting cardiorespiratory performance, systemic vascular resistance, and local microcirculatory (endothelial and myogenic) activity is permanently required (3). When unmet, the link between vascular damage and mobility loss is clear, as impairment regularly emerges with disease progression (6-9).

Routine daily exercise has been within the first line of therapeutic options in managing these patients. However, data on the impact of its implementation within an integrated healthcare strategy are still insufficient. Recent trials seem to confirm the beneficial potential of regular physical exercise, including walking, in the prevention of and recovery from cardiovascular conditions (10-12), yet some controversy persists. Regular physical activity seems to improve or even retard severe frailty in adults, although aerobic and resistance exercise may not be recommended (5,13). Exercise has also been recommended to improve lower limb hemodynamics in diabetic patients (9,14-16), even when neuropathy is already present (15). Results are not as clear in the presence of peripheral vascular disease (PVD), as the benefits of exercise seem to depend on the severity of the existing lesions and the presence of intermittent claudication (17,18). The patient’s compliance, motivation, and communication within the “rehabilitation cluster” (patient, therapist, family, other professionals) to support positive progress toward both clinical and meaningful goals are also important determinants (19). According to various studies, the main reason for failing prescribed (therapeutic) physical activity is the “lack of time” (20-22). Some pathological processes are known to create and perpetuate a cycle that discourages the patient from performing activities requiring mobility (4,6,8,18,23). Thus, the patient’s engagement is crucial, especially if accepting that even “small” exercises can be useful in vascular rehabilitation (19,23,24). Specific guidance involving a complex combination of aerobic exercise, strength education, flexibility coaching, and nutrition has been proposed to address many of these concerns (4,12,14,19,24,25).

## Introdução

A atividade física e o exercício controlado são comumente considerados componentes indispensáveis do bem-estar, úteis na prevenção (ou retardamento da progressão) de várias doenças, e capazes de favorecer a recuperação (1,2). O movimento e o exercício controlados são vistos como principais para as funções cardio-respiratórias e microcirculatórias necessárias ao normal desempenho do tecido (2-5). Para responder ao débito neuroendócrino que afeta o desempenho cardiorrespiratório é necessário um equilíbrio permanente e preciso que envolve a integridade estrutural, a resistência vascular sistêmica e a atividade microcirculatória local (endotelial e miogênica) (3). Quando este equilíbrio não existe, ocorre dano vascular e perda de mobilidade normalmente associados à progressão da doença (6-9). O exercício diário está dentro da primeira linha de opções terapêuticas para a intervenção nestes pacientes. No entanto, os dados sobre o impacto da sua implementação dentro de uma estratégia integrada de saúde ainda são insuficientes. Ensaio recentes parecem confirmar o potencial benefício do exercício físico regular, incluindo a caminhada, na prevenção e recuperação de doentes cardiovasculares (10-12). Contudo, persiste ainda alguma controvérsia. A atividade física regular parece melhorar ou mesmo retardar a fragilidade grave em adultos, embora o exercício aeróbico e de resistência pareçam não ser recomendados (5,13). O exercício também tem sido recomendado para melhorar a hemodinâmica dos membros inferiores em pacientes diabéticos (9,14-16), mesmo quando a neuropatia já está presente (15). Os resultados não são tão claros na presença de doença vascular periférica (DVP), pois os benefícios do exercício parecem depender da gravidade das lesões existentes e da presença de claudicação intermitente (17,18).

A adesão, motivação e comunicação do paciente quando integrado num grupo de reabilitação (paciente, terapeuta, família, outros profissionais) também são determinantes importantes para apoiar o progresso positivo em direção aos objetivos clínicos (19). De acordo com vários estudos, a principal razão para o falhanço na atividade física prescrita é a “falta de tempo” (20-22). Alguns processos patológicos são conhecidos por criar e perpetuar um ciclo que desencoraja o paciente a realizar atividades que exijam mobilidade (4,6,8,18,23). Por isso, o envolvimento do paciente é crucial, principalmente se aceitarmos que mesmo pequenos exercícios podem ser úteis na reabilitação vascular (19,23,24). Orientações

The impact of common low-intensity movement in the lower limb circulation has been a theme of study for our research group as we have sought relationships between movement and blood perfusion to identify and characterise the adaptive mechanisms involved (26-30). Recently we identified a centrally mediated response – the Prompt Adaptive Hemodynamic Response - in place of what we had believed to result from local interactions as in reactive hyperemia or in the venoarteriolar reflex (31). Moreover, we noted that simple challenges applied to a single limb, such as the reactive hyperemia associated with massage or a unipodal squat, would consistently impact blood perfusion in the other (contralateral) limb through this PAHR (28-31). Thus, we extended our research to investigate the impact of low-intensity short duration localised activity such as plantar flexion on foot microcirculation in the absence of disease. The objective of this exploratory study is to identify the distal perfusion variations related to the foot isometric plantar flexion in the upright position as close as possible to the normal physiological state.

## Material and Methods

### *Participants*

A convenience sample of sixteen healthy volunteers of both sexes (n=8 per sex) with a mean age of  $31.9 \pm 12.9$  years old was chosen from our university community. Selected participants were required to be normotensive, non-smokers, and free of any medication or food supplementation. Blood pressure, cardiac frequency, the Ankle-Brachial Index a recognised indicator of vascular health (32) and the Body Mass Index calculated by the Quetelet's formula ( $BMI = \text{weight}/\text{height}^2$ , expressed in  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (33,34) were also calculated. All participants reported some degree of physical activity, and some reported regular exercise, although none were athletes. All young women reported regular menstrual cycles. The general characteristics of the participant panel is summarized in Table 1.

específicas envolvendo uma combinação complexa de exercícios aeróbicos, educação de força, treinamento de flexibilidade e nutrição foram propostas para abordar muitas dessas preocupações (4,12,14,19,24,25).

O impacto do movimento comum de baixa intensidade na circulação dos membros inferiores tem sido um tema de trabalho para o nosso grupo de investigação, estudando relações entre movimento e perfusão sanguínea para identificar e caracterizar os mecanismos adaptativos envolvidos (26-30). Recentemente identificamos uma resposta centralmente mediada – a Resposta Rápida de Adaptação Hemodinâmica (PAHR). Em vez do que acreditávamos resultar de interações locais como ocorre na hiperemia reativa ou no reflexo venoarteriolar (31) verificámos que desafios simples aplicados a um único membro, como a hiperemia reativa associada à massagem ou o agachamento unipodal, modificam consistentemente a perfusão sanguínea no outro membro (contralateral) por meio desse PAHR (28-31). Assim, estendemos a nossa pesquisa para investigar o impacto da atividade localizada de baixa intensidade e de curta duração, como a flexão plantar, na microcirculação do pé na ausência de doença. O objetivo deste estudo exploratório foi identificar as variações de perfusão distal relacionadas com a flexão plantar isométrica do pé na posição ereta o mais próximo possível do estado fisiológico normal.

## Material e Métodos

### *Participantes*

Uma amostra de conveniência de dezasseis voluntários saudáveis de ambos os sexos (n=8 por sexo) com idade média de  $31,9 \pm 12,9$  anos foi escolhida dentro de nossa comunidade universitária. Os participantes selecionados deveriam ser normotensos, não fumadores e livres de qualquer medicação ou suplementação alimentar. Pressão arterial, frequência cardíaca, Índice Tornozelo-Braço um reconhecido indicador de saúde vascular (32) e Índice de Massa Corporal calculado pela fórmula de Quetelet ( $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ , expresso em  $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (33,34) também foram calculados. Todos os participantes relataram algum grau de atividade física, e alguns exercício regular, embora nenhum fosse atleta. Todas as mulheres jovens relataram ciclos menstruais regulares. As características gerais do painel de participantes estão resumidas na Tabela 1.

**Table 1** - Participants characterisation. Results are presented as medians and Q1-Q3 (25th empirical quartile - 75th quartile). Differences between groups assessed with the t-test or Mann-Whitney\* test for independent samples. BMI, Body Mass Index; SYSTP, Systolic pressure; DIASP, Diastolic Pressure; ABI, ankle-brachial index; PR, Pulse Rate; bpm, beats per minute.

**Tabela 1** - Caracterização dos participantes. Os resultados estão apresentados como medianas e Q1-Q3 (25º quartil empírico - 75º quartil empírico). Diferenças entre os grupos avaliados com o teste t ou Mann-Whitney\* para amostras independentes. IMC, Índice de Massa Corporal; Sistólica, pressão sistólica; Diastólica, Pressão Diastólica; ITB, índice tornozelo-braço; FP, Frequência de Pulso; bpm, batimentos por minuto.

	Men / Homens	Women / Mulheres	p
N (%)	8 (50)	8 (50)	–
Smokers / fumadores (%)	no (100)	no (100)	–
Exercise, h/week / Exercício, h/semana (Q1-Q3)	4 (3-7.5)	3 (0-4)	–
Age, years / Idade, anos (Q1-Q3)	27.0 (23-44)	25.0 (23.0-34.0)	1.000*
Weight, kg / Peso, kg (Q1-Q3)	76.5 (65.6-84.6)	71.0 (65.0-84.6)	0.796*
Height, m / Altura, m (Q1-Q3)	1.8 (1.7-1.7)	1.6 (1.6-1.7)	0.000*
BMI, kg/m <sup>2</sup> / IMC, kg/m <sup>2</sup> (Q1-Q3)	24.5 (21.5-25.8)	24.9 (23.5-30.6)	0.382
SYSTP, mmHg / Sistólica, mmHg (Q1-Q3)	122.0 (102.5-127.0)	124.0 (114.8-126.3)	0.334
DIASP, mmHg / Diastólica, mmHg (Q1-Q3)	73.0 (69.0-75.5)	82.0 (75.8-87.8)	0.067
ABI / ITB (Q1-Q3)	1.1 (1.1-1.2)	1.2 (1.1-1.3)	0.444
PR, bpm / FP, bpm (Q1-Q3)	71.5 (67.5-79.8)	84.5 (74.5-92.3)	0.086

The absence of recent pathology of the foot that could influence the ankle joint during plantar flexion was an exclusion criterion and confirmed upon selection. Other restrictions included refraining from caffeine and alcohol consumption 24 hours prior to measurements, as well as any topical (including cosmetic) application in the assessment areas.

Footedness, regarded as a measure of the preference (dominance) and performance of one limb, was determined by the validated Portuguese version of the Lateral Preference Inventory (LPI) (35) and compared with the laser Doppler flowmetry perfusion values, which were used as a biomarker.

All participants were previously informed of the objectives and phases of the study and provided their informed written consent. Procedures fully respected the principles of good clinical practice defined for human research (36) and were evaluated by the institutional Ethics Committee (EC.ECTS/P03.20 de 2020) prior to study initiation.

A ausência de patologia recente do pé que pudesse influenciar a articulação do tornozelo durante a flexão plantar foi critério de exclusão confirmado durante a seleção. Outras restrições incluíam a abstenção do consumo de cafeína e álcool 24 horas antes das medições, bem como qualquer aplicação tópica (incluindo cosmética) nas áreas de avaliação.

A “Footedness” considerada como uma medida de preferência (dominância) e desempenho de um membro, foi determinado pela versão portuguesa validada do Lateral Preference Inventory (LPI) (35) e comparada com os valores de perfusão de fluxometria de laser Doppler, usados como biomarcador.

Todos os participantes foram previamente informados sobre os objetivos e fases do estudo e deram o seu consentimento informado por escrito. Os procedimentos respeitaram integralmente os princípios de boa prática clínica definidos para pesquisa em humanos (36) e foram avaliados pelo Comitê de Ética institucional (EC.ECTS/P03.20 de 2020) antes do início do estudo.

### Experimental

Measurements were conducted in the research lab with controlled temperature ( $21 \pm 2$  °C), light and humidity (40 - 60%) conditions and performed by the same experienced operator-researcher. After adapting to the room conditions (approximately 15 minutes) in the standing position, participants completed a protocol divided into three phases: five minutes baseline recordings in a stable standing position with parallel feet (phase I); one minute of comfortable isometric plantar flexion of both feet (phase II); five minutes recovery from movement, returning to the baseline position (phase III). Blood perfusion was continuously measured in both feet simultaneously using non-invasive technology, specifically, laser Doppler flowmetry (LDF) (Perimed PF5010 System, Stockholm, Sweden) and polarised spectroscopy (PSP) via Tissue Viability Imaging® (TiVi) (TiVi701cam, WheelsBridge, Sweden). The LDF detects cutaneous blood perfusion (BP) variations through the Doppler effect (3,37). For this study, LDF probes were placed in the anterointernal region of each foot, one centimeter posterior to the first metatarsal-phalangeal joint (Figure 1).

The polarized spectroscopy system includes a digital camera equipped with polarized filters placed perpendicular to the skin, without contact, to record and analyse changes in the Concentration of Red Blood Cells (CRBC) in a relatively large chosen region of interest (ROI) (38). The chosen ROI was the dorsal region of both feet. Figure 2 shows a typical blood perfusion record obtained under these conditions. Pulse rate (PR) and arterial blood pressure were also monitored with a digital sphygmomanometer (Pic 22012000200 Esfigm Classic Check, Artsana S.p.A, Italy).

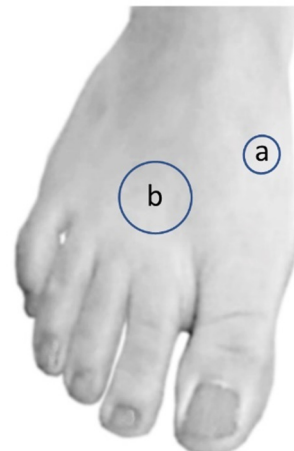
### Experimental

As medições foram realizadas no laboratório com condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2$  °C), luz e humidade (40 - 60%) e realizadas pelo mesmo experiente investigador. Após adaptação às condições da sala (aproximadamente 15 minutos) na posição ortostática, os participantes completaram um protocolo dividido em três fases: cinco minutos de medição de valores de base em posição ortostática estável com os pés paralelos (fase I); um minuto de flexão plantar isométrica confortável de ambos os pés (fase II); cinco minutos de recuperação do movimento, retornando à posição inicial (fase III). A perfusão sanguínea foi medida continuamente em ambos os pés simultaneamente usando tecnologia não invasiva, especificamente, fluxometria de laser Doppler (LDF) (Perimed PF5010 System, Estocolmo, Suécia) e espectroscopia polarizada (PSP) com o Tissue Viability Imaging® (TiVi) (TiVi701cam, WheelsBridge, Suécia). O LDF detecta variações da perfusão sanguínea (PA) cutânea através do efeito Doppler (3,37). Para este estudo, as sondas de LDF foram colocadas na região ântero-interna de cada pé, um centímetro posterior à primeira articulação metatarsofalângica (Figura 1).

O sistema de espectroscopia polarizada inclui uma câmera digital equipada com filtros polarizados colocados perpendicularmente à pele, sem contato, para registrar e analisar alterações na Concentração de Glóbulos Vermelhos (CRBC) em uma região de interesse escolhida (ROI) relativamente grande (38). A ROI escolhida foi a região dorsal de ambos os pés. A Figura 2 mostra um registro típico de perfusão sanguínea obtido nestas condições. A frequência de pulso (PR) e a pressão arterial também foram monitoradas com um esfigmomanômetro digital (Pic 22012000200 Esfigm Classic Check, Artsana S.p.A, Itália).

**Figure 1** - Schematic representation of foot regions used for data collection (a) by a laser Doppler flowmetry probe and (b) by non-contact polarized spectroscopy (see text).

**Figura 1** - Representação esquemática das regiões do pé usadas para recolha de dados (a) por uma sonda de fluxometria de laser Doppler e (b) por espectroscopia polarizada sem contato (ver texto).

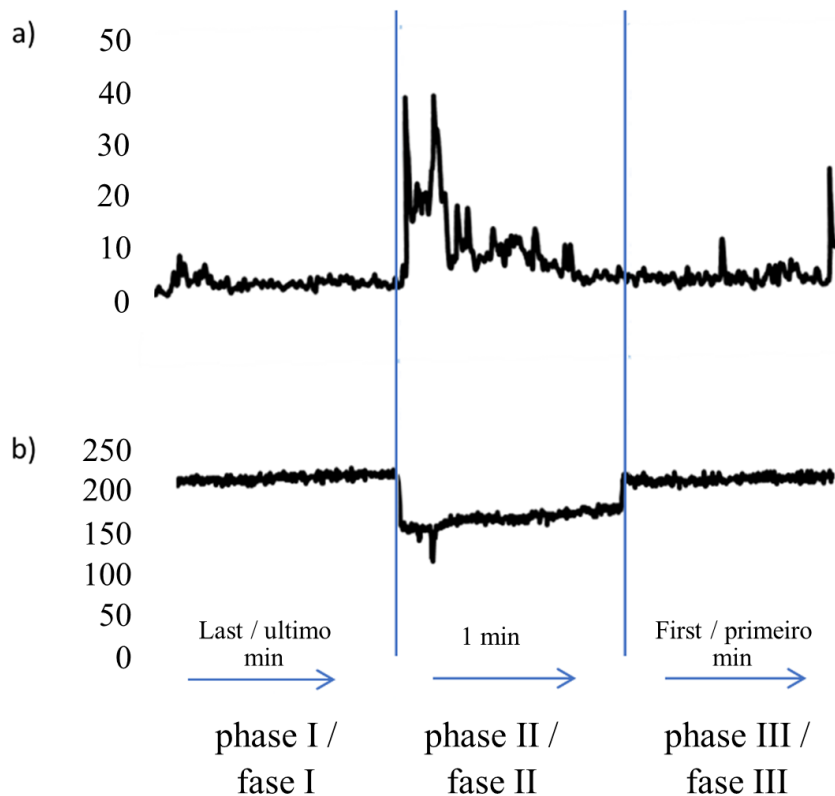


### Statistical Analysis

Descriptive and comparative statistics were performed with SPSS v.22.0 (IBM Corp. Amrock, NY, USA) and Jamovi software Version 2.2 (jamovi project, Sydney, AU). A 95% level of confidence was adopted throughout the analysis. The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of data distribution. The Student's t-test or the Mann-Whitney non-parametric test was used to assess differences for independent samples. Following normality and homogeneity testing, pairwise comparisons between feet were performed with Repeated Measures ANOVA with the post-hoc Tukey test to evaluate differences among variables. A post-hoc power analysis using the Jamovi software was also performed.

### Análise estatística

A estatística descritiva e comparativa foi realizada recorrendo ao SPSS v.22.0 (IBM Corp. Amrock, NY, EUA) e ao software Jamovi Versão 2.2 (projeto jamovi, Sydney, AU). Adotou-se um nível de confiança de 95% ao longo da análise. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade da distribuição dos dados. O teste t de Student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para avaliar as diferenças para amostras independentes. Após testes de normalidade e homogeneidade, as comparações pareadas entre os pés foram realizadas com o ANOVA para Medidas Repetidas e com o teste post-hoc de Tukey para avaliar as diferenças entre as variáveis. Foi também realizada uma análise de potência post-hoc usando o software Jamovi.



**Figure 2** - Illustrative example of typical perfusion records obtained under our experimental conditions in one participant's feet - (a) LDF Blood Perfusion (b) PSp Concentration of Red Blood Cells (see text)  
**Figura 2** - Exemplo ilustrativo dos registos de perfusão típicos obtidos sob as nossas condições experimentais nos pés de um participante - (a) Perfusão Sanguínea LDF (b) Concentração PSp de Glóbulos Vermelhos (ver texto)

**Table 2** - Perfusion differences between feet and across phases (n=16; p-value – Repeated Measures ANOVA, with Tukey post-hoc). LDF values are expressed in blood perfusion (arbitrary) units while PSp values are expressed in CRBC (concentration of red blood cells) arbitrary units. Presented values are mean ± (SD) (\*p < 0.05).

**Tabela 2** - Diferenças de perfusão entre os pés e entre as fases (n=16; valor de p – ANOVA de medidas repetidas, com post-hoc de Tukey). Os valores de LDF são expressos em unidades de perfusão sanguínea (arbitrárias), enquanto os valores de PSp são expressos em unidades arbitrárias de CRBC (concentração de glóbulos vermelhos). Os valores apresentados são a média ± (DP) (\*p < 0,05).

	LDF			PSp		
	Right foot / Pé direito	Left foot / Pé esquerdo	p-value*	Right foot / Pé direito	Left foot / Pé esquerdo	p-value*
phase I / fase I	11.42 ± (3.13)	10.80 ± (4.31)	0.987	206.1 ± (32.31)	199.2 ± (29.40)	0.425
phase II / fase II	18.81 ± (6.98)	17.03 ± (6.77)	0.958	184.7 ± (34.62)	180.5 ± (35.01)	0.883
phase III / fase III	11.60 ± (3.11)	10.88 ± (5.84)	0.997	211.7 ± (37.36)	203.8 ± (35.50)	0.225
p-value <sub>‡</sub>	< 0.001*	< 0.001*		< 0.001*	< 0.001*	

## Results

Blood perfusion values for both feet are shown in Table 2, using mean and standard deviation (SD) for all variables representing the totality of each period register. Results of the comparison analysis (*p-value*) between feet and across phases are also shown (Table 2).

The plantar flexion challenge (phase II) caused obvious and statistically significant blood perfusion changes in both feet, as could be expected. Blood perfusion measured by LDF significantly increased in both feet in phase II, and these differences disappeared in the recovery period. The CRBC index indicated a significant decrease of perfusion in both feet with a reduction of the previously detected perfusion asymmetries (Table 2).

Although not significant, there were different blood perfusion values obtained between paired feet with both (LDF and PSp) instruments. LDF recorded higher in the right foot in 67% of men and 44% of women. These results disagreed with the results of the LPI applied to determine footedness, which depicted a 94% dominance of the right foot for all participants. These perfusion asymmetries between right and left feet were always present in all phases when measured by LDF, more or less pronounced although not statistically significant (Figure 3).

## Resultados

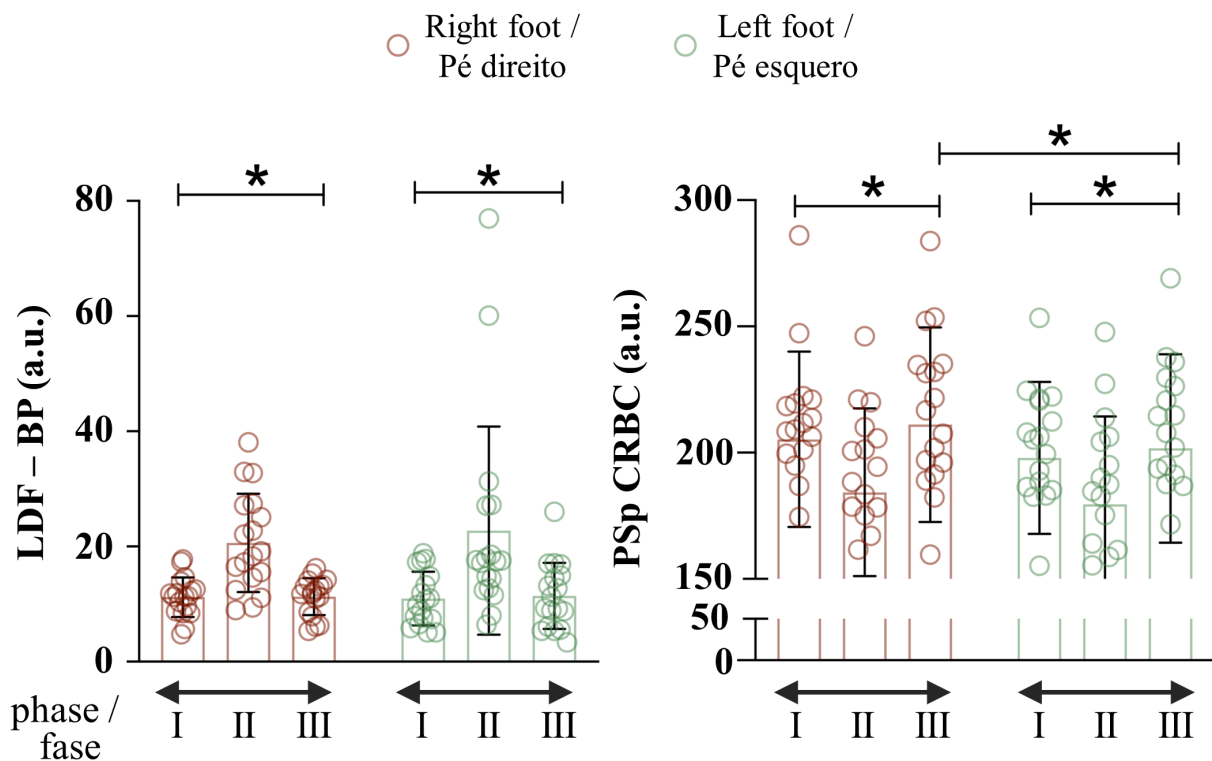
Os valores de perfusão sanguínea de ambos os pés são apresentados na Tabela 2, utilizando a média e o desvio padrão (DP) para todas as variáveis que representam a totalidade de cada registo em período. Os resultados da análise de comparação entre os pés e entre as fases (p) também são mostrados (Tabela 2).

O desafio da flexão plantar (fase II) causou alterações estatisticamente significativas na perfusão sanguínea em ambos os pés, como esperado. A perfusão sanguínea medida por LDF aumentou significativamente em ambos os pés na fase II, e essas diferenças desapareceram no período de recuperação. O índice CRBC indicou diminuição significativa da perfusão em ambos os pés com redução das assimetrias de perfusão previamente detectadas (Tabela 2).

Detectámos diferentes valores de perfusão sanguínea entre os pares de pés medidos com os dois instrumentos (LDF e PSp) embora não significativos. O LDF registrou ser maior no pé direito em 67% dos homens e 44% das mulheres. Esses resultados discordaram dos resultados do LPI aplicado para determinar a preferência de pé, que mostrou uma dominância de 94% do pé direito para todos os participantes. Essas assimetrias perfusionais entre os pés direito e esquerdo sempre estiveram presentes de modo mais ou menos pronunciadas em todas as fases, quando medidas pelo LDF embora sem significado estatístico (Figura 3)

Percentage differences between phases for both limbs and technologies are presented in Table 3. As shown, the LDF system detects higher perfusion amplitude differences compared with PSp. No differences between limbs were found, indicating that the plantar flexion induces the same response in both limbs. Exploratory tests to assess these delta differences between different age groups were also performed. The delta between phase II and III measured by the PSp for both limbs was significantly lower in the more mature adults ( $p=0.019$  right foot;  $p=0.027$  left foot), suggesting that age might influence the response. However, we should emphasize that due to the low number of participants these differences must be interpreted with caution and should be better explored in future studies with different design.

As diferenças percentuais entre as fases para ambos os membros e tecnologias são apresentadas na Tabela 3. Conforme apresentado, o sistema LDF detecta maiores diferenças de amplitude de perfusão em comparação com PSp. Não foram encontradas diferenças entre os membros, indicando que a flexão plantar induz a mesma resposta em ambos os membros. Testes exploratórios para avaliar estas diferenças entre faixas etárias também foram realizados. O delta entre as fases II e III medido pelo PSp para ambos os membros foi significativamente menor nos adultos mais velhos ( $p=0,019$  pé direito;  $p=0,027$  pé esquerdo), sugerindo que a idade pode influenciar a resposta. No entanto, devemos enfatizar que, devido ao baixo número de participantes, essas diferenças devem ser interpretadas com cautela, devendo ser melhor exploradas em estudos futuros.



**Figure 3** - Comparison of median perfusion values detected between right and left foot by LDF (blood perfusion) and PSp\_concentration of red-blood cells (CRBC) during the experimental protocol ( $n=16$ ). Pairwise comparisons between feet were performed with Repeated Measures ANOVA with the post-hoc Tukey test ( $*p < 0.05$ ).

**Figura 3** - Comparação dos valores medianos de perfusão detectados entre o pé direito e esquerdo por LDF (perfusão sanguínea) e PSp\_concentração de glóbulos vermelhos (CRBC) durante o protocolo experimental ( $n=16$ ). As comparações pareadas entre os pés foram realizadas com ANOVA de Medidas Repetidas com o teste post-hoc de Tukey ( $*p < 0,05$ ).



## Discussion

Our objective in the presented experimental setting was to characterise the impact of isometric plantar flexion of both feet, in an upright position, on blood perfusion.

Baseline analysis immediately revealed asymmetric blood perfusion between right and left feet, although not statistically significant (Table 2). Asymmetries have been described as differences between right and left, dominant and nondominant, preferred and nonpreferred or stronger and weaker limbs (39-41). Also referred to as footedness (or handedness for the upper limb), it reveals a complex aspect of human performance and cognitive-motor processes (39). In the absence of vascular disease, the physiological meaning of these asymmetries is far from being fully understood, but recent evidence suggests it to be particularly relevant in sports medicine. Footedness has been classified as a lesion risk factor for the preferred foot in the lower extremity (40,42) and is likely to be considered in the design of training or recovery programs. Despite the relevancy of this information, most of the procedures are used by convenience, and this lack of normalisation complicates the comparison of results and the determination of any true meaning (39,43). Additionally, some studies have associated blood flow with muscle mass (40,41), suggesting that circulatory stress might produce more asymmetries and promote muscle-perfusion lesions (40,43). Hemodynamics, muscle activation, and force generation have been proposed as explanations for this scale of strength or force competence between the paired limbs (40,43-46).

Under this view, the self-report limb preference to execute specific tasks seems to represent a poor indicator for this assessment. As previously mentioned, the Portuguese version of the LPI revealed a 94% dominance of the right foot for all participants. However, using LDF perfusion as a (reliable) biological marker (39,43,47) indicated higher perfusion in the right foot in 67% of men and 44% of women. Recent data has shown that even common activities such as gait require comparable amounts of blood flow for distal muscle activation in dominant and nondominant limbs (43,46). Therefore our results justify this option to establish the limb preference according to the higher blood perfusion values as measured by LDF.

## Discussão

O nosso objetivo foi caracterizar no presente contexto experimental, o impacto da flexão plantar isométrica na perfusão de ambos os pés na posição ereta.

A análise inicial revelou imediatamente uma perfusão assimétrica entre os pés direito e esquerdo, embora não estatisticamente significativa (Tabela 2). As assimetrias têm sido descritas como diferenças entre os membros direito e esquerdo, dominante e não dominante, preferido e não preferido ou mais fortes e fracos (39-41). Também conhecido como *footedness* (ou lateralidade quando relativa ao membro superior), este é um aspecto complexo do desempenho humano e dos processos cognitivo-motores (39). Na ausência de doença vascular, o significado fisiológico das assimetrias está longe de ser totalmente compreendido, mas evidências recentes sugerem que seja particularmente relevante na medicina desportiva. A *Footedness* foi classificado como um fator de risco de lesão para o pé preferido no membro inferior (40,42) e é provável que seja considerado no planeamento de programas de treino ou de recuperação. Apesar da relevância desta informação, a maioria dos procedimentos são utilizados por conveniência, e esta falta de normalização dificulta a comparação dos resultados e a compreensão do seu significado (39,43). Alguns estudos associaram o fluxo sanguíneo com a massa muscular (40,41), sugerindo que o stress circulatório pode produzir mais assimetrias e promover lesões de perfusão muscular (40,43). Hemodinâmica, ativação muscular e geração de força têm sido propostas como explicações para essa escala de força ou competência de força entre os pares de membros (40,43-46). Desse ponto de vista o autorrelato da preferência de membro para executar tarefas específicas parece representar um indicador fraco para essa avaliação. Como mencionado anteriormente, a versão em português do LPI revelou uma dominância de 94% do pé direito para todos os participantes. No entanto, usando a perfusão LDF como um marcador biológico (confiável) (39,43,47) indicou maior perfusão no pé direito em 67% dos homens e 44% das mulheres. Dados recentes mostraram que mesmo atividades comuns, como a marcha, requerem quantidades comparáveis de fluxo sanguíneo para ativação muscular distal em membros dominantes e não dominantes (43,46). Portanto, os nossos resultados justificam a opção de estabelecer a preferência do membro de acordo com os maiores valores de perfusão sanguínea medidos pelo LDF.

**Table 3** - Percentage difference in both feet between phases, for LDF and PSp. (n=16; p-value – Friedman test with the Durbin-Conover test for pairwise comparisons). Both LDF and PSp differences between phases are expressed percentage. Presented values are median with Q1 and Q3.

**Tabela 3** - Diferença percentual em ambos os pés entre as fases, para LDF e PSp. (n=16; valor p – teste de Friedman com teste de Durbin-Conover para comparações pareadas). As diferenças de LDF e PSp entre as fases são expressas em percentagem. Os valores apresentados são medianas com Q1 e Q3.

Delta	Right foot / Pé direito % (Q1; Q3)	Left foot / Pé esquerdo % (Q1; Q3)	p-value
$\Delta$ LDF phase II - phase I / fase II - fase I	51.8 (19.7; 106.3)	63.2 (40.7; 127.2)	0.801
$\Delta$ LDF phase III - phase II / fase III - fase II	-39.9 (-49.7; -20.2)	-37.5 (-60.0; -23.3)	0.654
$\Delta$ LDF phase III - phase I / fase III - fase I	6.9 (-4.8; 15.1)	5.2 (-4.2; 19.8)	0.765
$\Delta$ PSp phase II - phase I / fase II - fase I	-10.0 (-13.7; -4.0)	-7.5 (-14.9; -2.2)	0.785
$\Delta$ PSp phase III - phase II / fase III - fase II	14.5 (6.4; 16.8)	13.0 (5.9; 16.4)	0.683
$\Delta$ PSp phase III - phase I / fase III - fase I	2.6 (-2.1; 5.2)	4.9 (-2.2; 6.6)	0.497

Plantar flexion significantly increased blood perfusion as measured by LDF in both feet. Simultaneously, we observed an opposite effect with the PSp instrument, indicating a significant reduction of perfusion measured by CRBC (Table 3, Figure 3). To understand these two observations, we must keep in mind the particular vascular structure of human skin and the technologies used for blood perfusion measurement. The vasculature of the skin is organised in two plexus at different depths parallel to its surface (3). The superficial plexus involves numerous capillary loops that extend to the epidermis connecting small arterioles and venules near the papillary dermis. The lower plexus, near the dermal-hypodermal interface, includes arteries and veins from the underlying muscle and adipose tissue that perforate the fascia to form ascending arterioles and descending venules, connected to the superficial plexus (3). This peculiar structure allows blood to move between these two planes through that anastomosis network (31,48). In addition, the isometric contraction of the calf muscle displaces plantar pressure to the forefoot, facilitating the blood movement to the deeper structure (49,50).

The quantitative measurement of skin blood perfusion is commonly assessed by optical-based technologies, with LDF still regarded as the gold standard. These technologies use different lights and laser frequencies to operate, however, and thus measure at different depths and reveal different features (50). Our own experience supports the information provided by the manufacturer - that these LDF frequencies allow measurements up to 1 mm (50), while the PSp system measures more

A flexão plantar aumentou significativamente a perfusão sanguínea medida pelo LDF em ambos os pés. Simultaneamente, observamos efeito contrário com o instrumento PSp, indicando uma redução significativa da perfusão medida pelo CRBC (Tabela 3, Figura 3). Para entender essas duas observações, devemos ter em mente a estrutura vascular particular da pele humana e as tecnologias utilizadas para a medição da perfusão sanguínea. A vasculatura da pele é organizada em dois plexos em diferentes profundidades paralelas à sua superfície [3]. O plexo superficial envolve numerosas ansas capilares que se estendem até a epiderme, conectando pequenas arteríolas e vênulas próximas da derme papilar. O plexo inferior, próximo da interface dermo-hipodérmica, inclui artérias e veias do músculo subjacente e tecido adiposo que perfuram a fásia para formar arteríolas ascendentes e vênulas descendentes, ligadas ao plexo superficial (3). Essa estrutura peculiar permite que o sangue se mova entre esses dois planos através dessa rede de anastomoses (31,48). Além disso, a contração isométrica do músculo da perna desloca a pressão plantar para o antepé, facilitando o movimento do sangue para a estrutura mais profunda (49,50).

A quantificação da perfusão sanguínea da pele é comumente avaliada por tecnologias ópticas, sendo o LDF ainda considerado como o padrão de referência. Estas tecnologias utilizam diferentes luzes e frequências de laser, ou sejam medem em diferentes profundidades e revelam diferentes características (50). A nossa experiência corrobora a informação fornecida pelo fabricante de que as frequências de LDF permitem

superficially, likely reaching less than 0.5 mm (38). Considering these arguments, the blood perfusion increase detected by LDF and the blood perfusion decrease detected by PSp are coherent, signifying that plantar flexion is likely displacing blood along the superficial plexus to deeper levels. A previous study has shown that a short-term isometric contraction recruiting a large number of muscular fibres demands an increase in the local blood supply (51). Permanent communication between the lower limb muscle pump and the superficial plantar venous plexus also seems to contribute to these adaptive mechanisms (52). However, this substantial blood perfusion increment registered with the plantar flexion does not result from a local response but rather from the PAHR previously described by our group (28,31,53). Similar adaptive responses were observed in unipodal exercises with the contralateral limb at rest, with blood perfusion modification noted in both active and resting feet (29). Repeated plantar flexion seems to trigger this mechanism, resulting in rapid constriction of the superficial vessels and blood mobilization to the deeper vascular structures. The sustained pressure in the anterior plantar region associated with the posterior (leg) muscular pumping ensures local mechanics and hemodynamics (52). The rapid recovery to baseline values noticed in phase III (when movement ceased and the volunteers returned to a stable upright position) agrees with the previously observed and described mechanisms (26-28).

In our opinion, unsupervised home-based exercise including walking is still an underused and poorly explored therapeutic tool. Recent studies in vascular patients suggested more consistent outcomes with supervised exercise when compared with unsupervised approaches (54). However, results are ambiguous and analysis is still limited by the reduced number of studies and participants (54).

## Conclusion

Our results suggest that this easy-to-execute activity, requiring no specialised supervision, might be useful to promote muscular health and, in that direction, to be explored as a component of a person-centred home-based physical activity program. Relevant limitations to be pointed out include that: (i) the observational nature of our study, with a reduced number of participants, limits the extrapolation for the general population, and the identification of the influence of sex, age, and other potential determinants as well; (ii) results were obtained from healthy participants; thus time-related impacts in

medições de até 1 mm (50), enquanto o sistema PSp mede mais superficialmente, atingindo provavelmente menos de 0,5 mm (38). Considerando estes argumentos, o aumento da perfusão sanguínea detectado pela LDF e a diminuição da perfusão sanguínea detectada pela PSp são coerentes, significando que a flexão plantar provavelmente provoca um deslocamento do sangue do plexo superficial para níveis mais profundos.

Um estudo anterior mostrou que uma contração isométrica de curto prazo que recruta um grande número de fibras musculares exigem um aumento no suprimento sanguíneo local (51). A comunicação permanente entre a bomba muscular dos membros inferiores e o plexo venoso plantar superficial também parece contribuir para esses mecanismos adaptativos (52). No entanto, este aumento substancial da perfusão sanguínea registado com a flexão plantar não parece ser resultado de uma resposta local, mas sim da PAHR descrita anteriormente pelo nosso grupo (28,31,53). Respostas adaptativas semelhantes foram observadas em exercícios unipodais com o membro contralateral em repouso, com modificação da perfusão sanguínea observada nos pés ativos e em repouso (29). A flexão plantar repetida parece desencadear este mecanismo, resultando numa rápida constrição dos vasos superficiais e mobilização do sangue para as estruturas vasculares mais profundas. A pressão anterior sustentada na região plantar, associada ao bombeamento muscular posterior (perna) garante a mecânica local e a hemodinâmica (52). A rápida recuperação dos valores basais observados na fase III (quando o movimento cessou e os voluntários retornaram à posição vertical estável) concorda com os mecanismos observados e descritos anteriormente (26-28).

Na nossa opinião, o exercício não supervisionado, incluindo caminhada, realizado no domicílio ainda é uma ferramenta terapêutica subutilizada e pouco explorada. Estudos recentes em pacientes vasculares sugeriram resultados mais consistentes com os exercícios supervisionados quando comparados com abordagens não supervisionadas (54). No entanto, os resultados são ambíguos e a análise ainda é limitada pelo número reduzido de estudos e participantes (54).

## Conclusão

Os nossos resultados levam-nos a admitir que esta atividade de fácil execução, sem necessidade de supervisão especializada, pode ser útil para promover a saúde muscular e, nesse sentido, ser explorada

(specific) groups of cardiovascular patients were not established; (iii) experiments were conducted in the laboratory, different from the home-based scenario; (iv) a proper validation of procedures is needed; and (v) the proposed strategy is only applicable to individuals with adequate mobility. As we move forward and expand this research, these limitations will be fully addressed.

### **Acknowledgements**

To all participants, and to all CBIOS researchers involved in the reported studies.

### **Authors Contributions**

Conceptualization, LMR; Data curation, JG and MF; Investigation, MF; Methodology, LMR and MF; Supervision, LMR; Validation, LMR; Writing – original draft, LMR MF and JG; Writing – review & editing, LMR.

### **Disclosures**

The senior editor co-authoring this manuscript had no participation in the review nor in the decision process. All authors declare there were no financial and/or personal relationships that may present a potential conflict of interest.

### **Funding**

This study is supported by FCT - Foundation for Science and Technology, I.P., by the grants UIDB/04567/2020 and UIDP/ 04567/2020." The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

como componente de um programa de atividade física domiciliada, centrado na pessoa . Limitações relevantes a serem apontadas incluem (i) a natureza observacional do nosso estudo, com número reduzido de participantes, o que limita a extrapolação para a população geral bem como a identificação da influência do sexo, idade e outros potenciais determinantes; (ii) os resultados foram obtidos em participantes saudáveis pelo que o impacto em grupos (específicos) de pacientes cardiovasculares não foram estabelecidos; (iii) as experiências foram conduzidas em laboratório, o que difere do cenário domiciliado; (iv) é necessária uma validação adequada dos procedimentos; e (v) a estratégia proposta é aplicável apenas a indivíduos com mobilidade. À medida que avançamos e expandimos esta pesquisa, essas limitações deverão ser esclarecidas e ultrapassadas.

### **Agradecimentos**

A todos os participantes e investigadores do CBIOS envolvidos neste estudo.

### **Declaração e contribuição de autores**

Concepção, LMR; Análise de dados, JG e MF; Investigação, MF; Metodologia, LMR e MF; Supervisão, LMR; Validação, LMR; Escrita original, LMR, MF e JG; revisão e edição de escrita, LMR.

### **Conflito de interesses**

O editor senior envolvido na autoria deste manuscrito não tiveram qualquer participação no processo de revisão ou de decisão. Todos os autores declararam não haver relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses.

### **Financiamento**

Este estudo é financiado pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., através dos financiamentos UIDB/04567/2020 e UIDP/ 04567/2020. Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho do estudo, recolha e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

## References / Referências

- Englesbe, M.J., Lussiez, A.D., Friedman, J.F., Sullivan, J.A., Wang, S.C. (2015). Starting a surgical home. *Annals of Surgery* 262, 901–903. doi: 10.1097/SLA.0000000000001250.
- Posadzki, P., Pieper, D., Bajpai, R., Makaruk, H., Könsgen, N., Neuhaus, A.L., et al. (2020). Exercise/physical activity and health outcomes: an overview of Cochrane systematic reviews. *BMC Public Health*; 20(1), 1724. doi:10.1186/s12889-020-09855-3.
- Cracowski, J. L., & Roustit, M. (2020). Human Skin Microcirculation. *Comprehensive Physiology*, 10(3), 1105–1154. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190008>
- Castell, M.V., Gutiérrez-Misis, A., Sánchez-Martínez, M., Prieto, M.A., Moreno, B., Nuñez, S., et al. & MEFAP Group. (2019) Effectiveness of an intervention in multicomponent exercise in primary care to improve frailty parameters in patients over 70 years of age (MEFAP-project), a randomised clinical trial: rationale and study design. *BMC Geriatrics*; 19(1), 25. doi:10.1186/s12877-018-1024-8.
- de Labra, C., Guimaraes-Pinheiro, C., Maseda, A., Lorenzo, T., Millán-Calenti, J.C. (2015) Effects of physical exercise interventions in frail older adults: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Geriatrics*, 15,154. doi:10.1186/s12877-015-0155-4.
- Criqui, M.H., Matsushita, K., Aboyans, V., Hess, C.N., Hicks C.W., Kwan T.W., et al. & American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Peripheral Vascular Disease; and Stroke Council. (2021). Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Contemporary Epidemiology, Management Gaps, and Future Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 144(9): e171–e191. doi:10.1161/CIR.0000000000001005.
- Howlett, S.E., Rutenberg, A.D., Rockwood, K. (2021). The degree of frailty as a translational measure of health in aging. *Nature Aging*, 1, 651–665. doi:10.1038/s43587-021-00099-3.
- Tern, P., Kujawiak, I., Saha, P., Berrett, T. B., Chowdhury, M. M., & Coughlin, P. A. (2018). Site and Burden of Lower Limb Atherosclerosis Predicts Long-term Mortality in a Cohort of Patients With Peripheral Arterial Disease. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*, 56(6), 849–856. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2018.07.020>
- Yazdanpanah, L., Nasiri, M., & Adarvishi, S. (2015). Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World journal of diabetes*, 6(1), 37–53. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i1.37>.
- Baroudi, L., Newman, M.W., Jackson, E.A., Barton, K., Shorter, K.A., Cain, S.M. (2020). Estimating Walking Speed in the Wild. *Frontiers in Sports and Active Living*. 2, 583848. doi:10.3389/fspor.2020.583848.
- Dunford, E.C., Valentino, S.E., Dubberley, J., Oikawa, S.Y., McGlory, C., Lonn, E., et al. (2021). Brief Vigorous Stair Climbing Effectively Improves Cardiorespiratory Fitness in Patients With Coronary Artery Disease: A Randomized Trial. *Frontiers in Sports and Active Living*. 3, 630912. doi:10.3389/fspor.2021.630912.
- Smith-Ryan, A.E., Weaver, M.A., Viera, A.J., Weinberger, M., Blue M., Hirsch, K.R. (2021). Promoting Exercise and Healthy Diet Among Primary Care Patients: Feasibility, Preliminary Outcomes, and Lessons Learned From a Pilot Trial With High Intensity Interval Exercise. *Frontiers in Sports and Active Living*. 3:690243. doi:10.3389/fspor.2021.690243.
- Liu, C. K., & Fielding, R. A. (2011). Exercise as an intervention for frailty. *Clinics in geriatric medicine*, 27(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2010.08.001>
- Colberg, S.R., Sigal, R.J., Fernhall, B., Regensteiner, J.G., Blissmer, B.J., Rubin, R.R., et al. (2010) American College of Sports Medicine, & American Diabetes Association. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care*. 33(12):e147–e167. doi:10.2337/dc10-9990.
- Kluding, P.M., Bareiss, S.K., Hastings, M., Marcus, R.L., Sinacore, D.R., Mueller, M.J. (2017). Physical Training and Activity in People With Diabetic Peripheral Neuropathy: Paradigm Shift. *Physical Therapy*. 97(1): 31–43. doi:10.2522/ptj.20160124.
- Williams, D. T., Price, P., & Harding, K. G. (2006). The influence of diabetes and lower limb arterial disease on cutaneous foot perfusion. *Journal of vascular surgery*, 44(4), 770–775. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.06.040>
- Polonsky, T.S., McDermott, M.M. (2021). Lower Extremity Peripheral Artery Disease Without Chronic Limb-Threatening Ischemia: A Review. *JAMA*. 325(21), 2188–2198. doi:10.1001/jama.2021.2126.
- Olin, J. W., & Sealove, B. A. (2010). Peripheral artery disease: current insight into the disease and its diagnosis and management. *Mayo Clinic proceedings*, 85(7), 678–692. <https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0133>.
- Dekker, J., de Groot, V., Ter Steeg, A.M., Vloothuis, J., Holla, J., Collette, E., Satink, T., Post, L., et al. (2020). Setting meaningful goals in rehabilitation: rationale and practical tool. *Clinical Rehabilitation*. 34(1):3–12. doi:10.1177/0269215519876299.
- Godin, G. (1994). Theories of reasoned action and planned behavior: usefulness for exercise promotion. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 26, 1391–1394. doi: 10.1249/00005768-199411000-00014.
- Booth, F. W., Gordon, S. E., Carlson, C. J., & Hamilton, M. T. (2000). Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 88(2), 774–787. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.2.774>.
- Korkiakangas, E. E., Alahuhta, M. A., & Laitinen, J. H. (2009). Barriers to regular exercise among adults at high risk or diagnosed with type 2 diabetes: a systematic review. *Health promotion international*, 24(4), 416–427. <https://doi.org/10.1093/heapro/dap031>.
- Smolderen, K. G., Hoeks, S. E., Pedersen, S. S., van Domburg, R. T., de Liefde, I. I., & Poldermans, D. (2009). Lower-leg symptoms in peripheral arterial disease are associated with anxiety, depression, and anhedonia. *Vascular medicine (London, England)*, 14(4), 297–304. <https://doi.org/10.1177/1358863X09104658>
- Gerhard-Herman, M.D., Gornik, H.L., Barrett, C., Barshes, N.R., Corriere, M.A., Drachman, D.E., et al. (2017). AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 135(12):e726–e779. doi:10.1161/CIR.0000000000000471.
- Writing Committee Members, Otto, C. M., Nishimura, R. A., Bonow, R. O., Carabello, B. A., Erwin, J. P., 3rd, Gentile, F., Jneid, H., Krieger, E. V., Mack, M., McLeod, C., O’Gara, P. T., Rigolin, V. H., Sundt, T. M., 3rd, Thompson, A., & Toly, C. (2021). 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 77(4), 450–500. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.035>
- Florindo, M., Nuno, S., Rodrigues, L.M. (2019). Studying the human lower limb perfusion dynamics with the step in place model. *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 16(2):195-201. doi:10.19277/bbr.16.2.212.
- Florindo, M., Nuno, S. L., & Rodrigues, L. M. (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>.
- Nuno, S., Florindo, M., Silva, H., Rodrigues, L.M. (2020). Studying the impact of different body positioning, squatting, and unipodal flexion on perfusion in the lower limb – an exploratory approach complemented with optical spectroscopy (TiVi). *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 17(2):187-196. doi: 10.19277/bbr.17.2.235.

29. Nuno, S., Florindo, M., Rodrigues, L.M. (2020). The unipodal flexion evokes an adaptive microcirculatory reflex in the contralateral foot. *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 17(2): 1-294. doi: 10.19277/bbr.17.2.243.
30. Rocha, C., Macedo, A., Nuno, S., Silva, H., Ferreira, H., Rodrigues, L.M. (2018). Exploring the perfusion modifications occurring with massage in the human lower limbs by non-contact polarized spectroscopy. *Biomedical & Biopharmaceutical Research* 15(2):196-204. doi: 10.19277/bbr.15.2.186.
31. 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 (Bethesda, Md. : 1985)*, 128(5), 1217–1226. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00437.2019>.
32. Aboyans, V., Criqui, M.H., Abraham, P., Allison, M.A., Creager, M.A., Diehm, C., et al., (2012). American Heart Association Council on Peripheral Vascular Disease, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia. Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 126(24):2890–2909. doi:10.1161/CIR.0b013e318276fbc6.
33. Garrow, J. S., & Webster, J. (1985). Quetelet's index (W/H<sup>2</sup>) as a measure of fatness. *International journal of obesity*, 9(2), 147–153.
34. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. (1995). *World Health Organization technical report series*, 854, 1–452.
35. Atalaia, T., Abrantes, J., Caldas, A.C. (2015). Cross-cultural adaptation and reliability of the Portuguese version of the Lateral Preference Inventory for the laterality profile assessment. *Salutis Scientia*, 7, 1-15.
36. World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20):2191–2194. doi:10.1001/jama.2013.281053
37. 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. <https://doi.org/10.1007/s10103-007-0524-0>
38. O'Doherty, J., Henricson, J., Anderson, C., Leahy, M. J., Nilsson, G. E., & Sjöberg, F. (2007). Sub-epidermal imaging using polarized light spectroscopy for assessment of skin microcirculation. *Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 13(4), 472–484. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00253.x>
39. Grouios, G. (2005). Footedness as a potential factor that contributes to the causation of corn and callus formation in lower extremities of physically active individuals. *The Foot*, 15 (3) 54-162. <https://doi.org/10.1016/j.foot.2005.05.003>.
40. Bishop, C., Read, P., Chavda, S., Turner, A. (2016). Asymmetries of the Lower Limb: The Calculation Conundrum in Strength Training and Conditioning. *Strength and Conditioning Journal*, 38(6):27-32. doi:10.1519/SSC.0000000000000264.
41. Rodrigues, L.M., Rocha, C.G., Florindo, M.E., Gregório, J. (2021). Lower Limb Perfusion Asymmetries in Humans at Rest and Following Activity—A Collective View. *Symmetry*, 13(12):2348. <https://doi.org/10.3390/sym13122348>
42. Beynon, B. D., Murphy, D. F., & Alosa, D. M. (2002). Predictive Factors for Lateral Ankle Sprains: A Literature Review. *Journal of athletic training*, 37(4), 376–380.
43. van Melick, N., Meddeler, B.M., Hoogeboom, T.J., Nijhuis-van der Sanden, M.W.G., van Cingel, R.E.H. (2017). How to determine 89876.
44. Heil, J., Loffing, F., Büsch, D. (2020). The Influence of Exercise-Induced Fatigue on Inter-Limb Asymmetries: a Systematic Review. *Sports Medicine - Open* 6(1):39. doi:10.1186/s40798-020-00270-x.
45. Vaisman, A., Guiloff, R., Rojas, J., Delgado, I., Figueroa, D., & Calvo, R. (2017). Lower Limb Symmetry: Comparison of Muscular Power Between Dominant and Nondominant Legs in Healthy Young Adults Associated With Single-Leg-Dominant Sports. *Orthopaedic journal of sports medicine*, 5(12), 2325967117744240. <https://doi.org/10.1177/2325967117744240>.
46. Maloney S. J. (2019). The Relationship Between Asymmetry and Athletic Performance: A Critical Review. *Journal of strength and conditioning research*, 33(9), 2579–2593. <https://doi.org/10.1519/JSC.00000000000002608>
47. Rodrigues, L. M., Nuno, S. L., Granja, T., Florindo, M. E., Gregório, J., & Atalaia, T. (2022). Perfusion, Stance and Plantar Pressure Asymmetries on the Human Foot in the Absence of Disease—A Pilot Study. *Symmetry*. 14(3), 441. <https://doi.org/10.3390/sym14030441>
48. Carter, S.J., Hodges, G.J. (2011). Sensory and sympathetic nerve contributions to the cutaneous vasodilator response from a noxious heat stimulus. *Exp Physiol*. 96(11):1208-1217. doi: 10.1113/expphysiol.2011.059907.
49. Bergstrand, S., Lindberg, L.G., Ek, A.C., Linde, M., Lindgren, M. (2009). Blood flow measurements at different depths using photoplethysmography and laser Doppler techniques. *Skin Research and Technology*, 15, 139–147 doi: 10.1111/j.1600-0846.2008.00337.x
50. Rodrigues, L. M., Rocha, C., Ferreira, H., & Silva, H. (2019). Different lasers reveal different skin microcirculatory flowmotion - data from the wavelet transform analysis of human hindlimb perfusion. *Scientific reports*, 9(1), 16951. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53213-2>
51. Richards, J. C., Crecelius, A. R., Kirby, B. S., Larson, D. G., & Dinunno, F. A. (2012). Muscle contraction duration and fibre recruitment influence blood flow and oxygen consumption independent of contractile work during steady-state exercise in humans. *Experimental physiology*, 97(6), 750–761. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.062968>
52. Broderick, B. J., Corley, G. J., Quondammatteo, F., Breen, P. P., Serrador, J., & Ólaighin, G. (2010). Venous emptying from the foot: influences of weight bearing, toe curls, electrical stimulation, passive compression, and posture. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 109(4), 1045–1052. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00231.2010>
53. Florindo, M., Nuno, S., Andrade, S., Rocha, C., Rodrigues, L.M. (2021). The acute modification of the upper-limb perfusion in vivo evokes a prompt adaptive hemodynamic response to re-establish cardiovascular homeostasis. *Physiology21 Annual Conference Abstract Book*. available at <https://static.physoc.org/app/uploads/2021/06/10115155/Physiology-2021-Abstract-Book.pdf>
54. Hageman, D., Fokkenrood, H. J., Gommans, L. N., van den Houten, M. M., & Tejjink, J. A. (2018). Supervised exercise therapy versus home-based exercise therapy versus walking advice for intermittent claudication. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD005263. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005263.pub4>