

## Influência da variação gradual da temperatura na resposta microcirculatória cutânea a estímulos térmicos

*Influence of temperature gradual variation over skin microcirculation responses to thermal stimulation*

**Pedro Contreiras Pinto, Helena Valente Vargas, Luis Monteiro Rodrigues**

Unidade de Dermatologia Experimental, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

E-mail: pcontreiras@ulusofona.pt

---

### Resumo

O estudo dos mecanismos envolvidos na regulação da temperatura a nível local constituem modelos para o estudo da patologia vascular, especialmente quando existe envolvimento ou comprometimento endotelial. Neste estudo pretende-se sistematizar e comparar a resposta a diferentes variações locais de temperatura, entre 42 e 44°C em indivíduos saudáveis, verificando a influência da velocidade de aquecimento na resposta local. Realizaram-se protocolos de aquecimento local da pele a 42 e 44°C nos antebraços definidos aleatoriamente de 10 voluntários do género feminino, saudáveis e não fumadoras. Avaliou-se a resposta microcirculatória através de Fluxometria por Laser Doppler durante 30 minutos. Calculou-se um novo parâmetro “razão vale/pico” (V/P) para distinguir os tipos de resposta possíveis, a saber, bifásico quando  $V/P < 1$  e monofásico quando  $V/P > 1$ . Verificou-se que a 42°C se obtém um perfil de resposta bifásico, independentemente da velocidade de aquecimento, assim como a 44°C se obteve sempre um perfil monofásico, indicando que a resposta ao aquecimento local depende da velocidade de aquecimento e, provavelmente, da activação das fibras nociceptoras.

**Palavras-chave:** Microcirculação, hiperémia térmica, laser doppler.

---

### Abstract

The study of the mechanisms involved in the local temperature control is a model used to understand vascular pathology, especially when endothelium dysfunction is the issue. This study aims to systematize and to compare the response to local changes in temperature, by studying the influence of the heating rate over the response. Several local heating protocols working at 42 or 44°C were performed in the forearm of healthy, female, non smokers volunteers (n=10). Skin microcirculation was evaluated by Laser Doppler Flowmetry during 30 minutes. A new parameter “nadir/peak” (N/P) was calculated to distinguish the shape of the hyperemic response - biphasic when  $N/P < 1$  and monophasic when  $N/P > 1$ . At 42°C the shape is biphasic, independently of the rate of heating. At 44°C the shape was always monophasic. This suggested that local response to heating is dependent from the rate of heating and probably from the activation of nociceptor fibers.

**Keywords:** Microcirculation, thermal hyperemia, Laser Doppler

---

## Introdução

A resposta da microcirculação cutânea ao aumento local da temperatura tem sido utilizada como um modelo para o estudo da doença vascular, especialmente quando está envolvida a disfunção endotelial<sup>[1,2]</sup>. São várias as patologias que apresentam a resposta à hiperémia térmica alterada, nomeadamente a diabetes<sup>[3-5]</sup>, a hipertensão<sup>[6]</sup>, o fenómeno de Raynaud<sup>[7,8]</sup>, a esclerose sistémica<sup>[8]</sup>, a doença periférica arterial obstrutiva (PAOD)<sup>[9]</sup> ou a síndrome de taquicardia postural (POTS)<sup>[10]</sup>, tornando-se por isso essencial conhecer os mecanismos envolvidos nesta forma de regulação.

Na pele não glabra, o complexo e ainda pouco conhecido sistema de termoregulação cutânea, é composto por diversos mecanismos neuronais e humorais:

- Um Sistema Vasoconstritor Noradrenérgico Simpático, em que os nervos vasoconstritores simpáticos libertam norepinefina<sup>[7,11]</sup>, neuropeptido Y (NPY)<sup>[7,12]</sup> e adenosina<sup>[7]</sup>, provocando vasoconstrição cutânea. Este mecanismo é responsável pela regulação da temperatura em ambientes termicamente neutros ou durante a exposição ao frio<sup>[7]</sup>.

- Um Sistema Vasodilatador Simpático, que só intervém no aumento da temperatura central, por exemplo, durante o exercício físico, ou na exposição directa ao calor<sup>[7]</sup>. Existem evidências da intervenção de mediadores químicos como o Óxido Nítrico (NO)<sup>[2,7,1-15]</sup>, a acetilcolina<sup>[11,14,16-18]</sup> e o péptido intestinal vasoactivo (VIP)<sup>[16,17,19]</sup>.

- O Endotélio Vascular, com um papel importante na resposta ao aquecimento local da pele, através da libertação de substâncias vasodilatadoras, como o NO<sup>[3,11,13]</sup>, as prostaciclina<sup>[3,6]</sup> e o factor hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)<sup>[3,6]</sup>.

- A Actividade Local Nociceptiva, cuja resposta vascular, efectuada através da activação das fibras C nociceptivas<sup>[3,7,20,21]</sup>, provoca vasodilatação local, via libertação antidrómica do péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP)<sup>[6,7,22,23]</sup>, da substância P<sup>[3,7,22,24]</sup> e da neuroquinina A<sup>[7,22]</sup>.

Em indivíduos saudáveis, o aquecimento local da pele a 42°C apresenta uma resposta bifásica, com um aumento rápido do fluxo sanguíneo nos primeiros 3 a 5 minutos, dependente do envolvimento da actividade local das fibras C aferentes<sup>[5,7,25-28]</sup>, e da estimulação dos receptores vaniloide tipo 1 (VR1). Estes receptores são também estimulados directamente pelo calor<sup>[7,18]</sup>, conforme tem sido sugerido por vários estudos. Após esta fase inicial, segue-se uma ligeira diminuição do fluxo de sangue, seguida de uma subida lenta que estabiliza num plateau, 25 a 30 minutos após o aquecimento<sup>[4,7,25,29,30]</sup>. Esta segunda fase de resposta, parece não sofrer qualquer influência da actividade

## Introduction

The microcirculation response to local temperature increase has been used as a model for the study of vascular disease, especially when endothelial dysfunction is involved<sup>[1,2]</sup>. Several pathologies are known to present an impaired thermal response to hyperemia, such as diabetes<sup>[3,5]</sup>, hypertension<sup>[6]</sup>, Reynaud's<sup>[7,8]</sup>, systemic sclerosis<sup>[8]</sup>, Peripheral Arterial Obstructive Disease (PAOD)<sup>[9]</sup> or Postural Tachycardia Syndrome<sup>[10]</sup>. Therefore it is essential to know the mechanisms involved in this kind of regulation.

In the non glabrous skin, the complex and still partially unknown skin thermoregulatory system, is based on several neural and humoral mechanisms:

- A Sympathetic Noradrenergic Vasoconstrictor System, in which the sympathetic vasoconstrictor nerves release noradrenalin<sup>[7,11]</sup>, neuropeptide Y (NPY)<sup>[7,11]</sup> and adenosine<sup>[7]</sup>, inducing skin vasoconstriction. This mechanism is responsible for the temperature regulation in neutral environments or during exposure to cold<sup>[7]</sup>.

- A Sympathetic Vasodilator System, which is initiated following an increase in core temperature, such as during exercise, or direct exposure to heat<sup>[7]</sup>. Nitric Oxide (NO)<sup>[2,7,12-15]</sup>, acetylcholine<sup>[11,14,16-18]</sup> and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)<sup>[16,17,19]</sup> seems to intervene in the vasodilation response.

- The Vascular endothelium, with an important role in the response to local heating, by releasing vasodilator mediators, such as NO<sup>[3,11,13]</sup>, prostaciclins<sup>[3,6]</sup> and Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)<sup>[3,6]</sup>.

- The Local Nociceptive Activity, which induces a vascular response, by the activation of nociceptive C fibers<sup>[3,7,20,21]</sup>, inducing a local vasodilation, through the antidromic release of Gene Related Calcitonin Peptide (CGRP)<sup>[6,7,22,25]</sup>, Substance P<sup>[3,7,22,24]</sup> and neurokinine A<sup>[7,22]</sup>.

In healthy volunteers, the skin local heating at 42°C shows a biphasic response, with a fast increase in blood flow in the first 3 to 5 minutes, which depends from the local afferent C fibers activity<sup>[5,7,25-28]</sup>, and the stimulation of Type 1 Vanilloid receptors (VR1). This receptors are also activated by heat, as suggested by several studies<sup>[7,18]</sup>. Following this initial phase, there is a nadir, and a slow increase in blood flow that reaches a plateau 25 to 30 minutes after heating<sup>[4,7,25,29,30]</sup>. This second phase is attributed to the release of local mediators such as NO from the endothelium, since it is not influenced by the neuronal activity<sup>[4,7,12,26,30-32]</sup>.

Although the response to 42°C has been widely studied<sup>[4,5,7,8,16,29,33,34]</sup> there are other studies using temperatures ranging from 39°C<sup>[13,14,31,35]</sup> to 44°C<sup>[25,35,36]</sup>. In these studies some involved mechanisms are not totally clear, specially regarding the involvement of

neuronal, mas sim depender da libertação de mediadores locais, principalmente NO, a partir do endotélio dos vasos<sup>[4,7,12,26,30-32]</sup>.

Apesar da resposta local a temperaturas de 42°C ser mais estudada<sup>[4,5,7,8,16,29,33,34]</sup> existem também outros estudos realizados com temperaturas que podem variar desde os 39°C<sup>[13,14,31,35]</sup> até aos 44°C<sup>[25,35,36]</sup>, subsistindo ainda alguns mecanismos por esclarecer, nomeadamente o envolvimento dos vários mediadores químicos na resposta local, especialmente quando a vasodilatação é máxima<sup>[30]</sup>. Nestas situações, nomeadamente se a temperatura atingir os 44°C, a resposta microcirculatória apresenta um perfil diferente do anterior, chegando-se imediatamente a um plateau<sup>[9,29]</sup>. Esta discrepância na resposta vasodilatadora local poderá indiciar um mecanismo diferente daquele obtido a temperaturas inferiores, especialmente porque em estudos anteriores, verificámos que esta resposta máxima seria pouco influenciada pelo envolvimento neuronal<sup>[29]</sup> e pela libertação de mediadores locais, como o NO<sup>[30]</sup>.

Tem sido, por isso, sugerido que a temperatura e a velocidade de aquecimento influenciam o tipo de resposta, razão pela qual, o presente estudo tenta sistematizar e caracterizar a resposta da microcirculação cutânea a temperaturas de aquecimento de 42 e 44°C.

## Material e métodos

### *Voluntários*

Este estudo envolveu 10 voluntários do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 21 e os 36 anos (média 28,5 ±4,2 anos), saudáveis, sem qualquer patologia dermatológica ou circulatória declarada, não fumadores, não hipertensos e não sujeitos a medicação vasoactiva. Os voluntários abstiveram-se de cafeína no dia das medições. Antes da análise todos os voluntários foram informados sobre o estudo e deram o seu consentimento informado por escrito. A investigação decorreu conforme os princípios da Declaração de Helsínquia e emendas subsequentes<sup>[37]</sup>. Todas as medições foram realizadas após um período de aclimação de 20 minutos, a temperatura e humidade relativa controladas. Foi ainda medida a pressão arterial de cada voluntário e registada a fase do ciclo menstrual em que se encontravam.

As medições locais do fluxo sanguíneo (expressas em BPU) foram realizadas por Fluxometria por Laser Doppler, LDF (Periflux PF5010, Perimed, Suécia).

chemical mediators in the local response with maximum dilation<sup>[30]</sup>. In these situations, when the heating temperature reaches 44°C, the microcirculatory response exhibit a different behavior, with a plateau being immediately obtained<sup>[9,29]</sup>. This local response could suggest a different mechanism, particularly because previous studies have shown that this maximum response was not influenced by neuronal involvement<sup>[29]</sup>, nor by the release of local mediators, such as NO<sup>[30]</sup>.

It has been suggested that temperature and heating rate could influence the hyperemic response. So, the present study tries to characterize the skin microcirculatory response at temperatures of 42 and 44°C, and to disclose the influence of the heating rate in the response.

## Materials and Methods

### *Volunteers*

This study involved 10 healthy, female volunteers, ages ranging from 21 to 36 years old (mean 28,5 ±4,2 y.o.), without any dermatologic or circulatory declared pathology, non smokers, non hypertensive, and without any medication. All volunteers were restrained from caffeine drinks in the day of the study. As part of the selection process, volunteers expressed their informed written consent. All procedures occurred according with the principles of Helsinki Declaration, and subsequent amendments<sup>[37]</sup>. Experiments took place following a 20 min acclimatization period, with controlled temperature and relative humidity. Blood pressure and menstrual cycle phase were measured and registered.

Local measurements of blood flow (BPU's) were obtained by Laser Doppler Flowmetry, LDF (Periflux PF5010, Perimed, Sweden).

### Protocolos

Foram cumpridos 4 protocolos de aquecimento - dois de aquecimento rápido e dois de aquecimento lento, previamente estabelecidos e informaticamente programados (Periflux PF5020, Perimed, Suécia). As medições foram efectuadas em zonas diferentes do antebraço, evitando os vasos de maior calibre à superfície (selecção aleatória da zona e do antebraço). Todos os protocolos foram iniciados com a manutenção da temperatura a 34°C, durante 5 minutos, de forma a garantir condições basais semelhantes.

Nos protocolos de aquecimento rápido a temperatura foi aumentada instantaneamente para 42 ou 44°C (Protocolos R42 e R44). Nos protocolos de aquecimento lento a temperatura foi gradualmente elevada (1°C a cada 30 s) até 42 ou 44°C (Protocolos L42 e L44). Em ambas as formas de aquecimento manteve-se a temperatura elevada até se atingir 30 minutos de aquecimento. A variação da temperatura ao longo do tempo, nos diversos protocolos, pode ser visualizada na Figura 1.

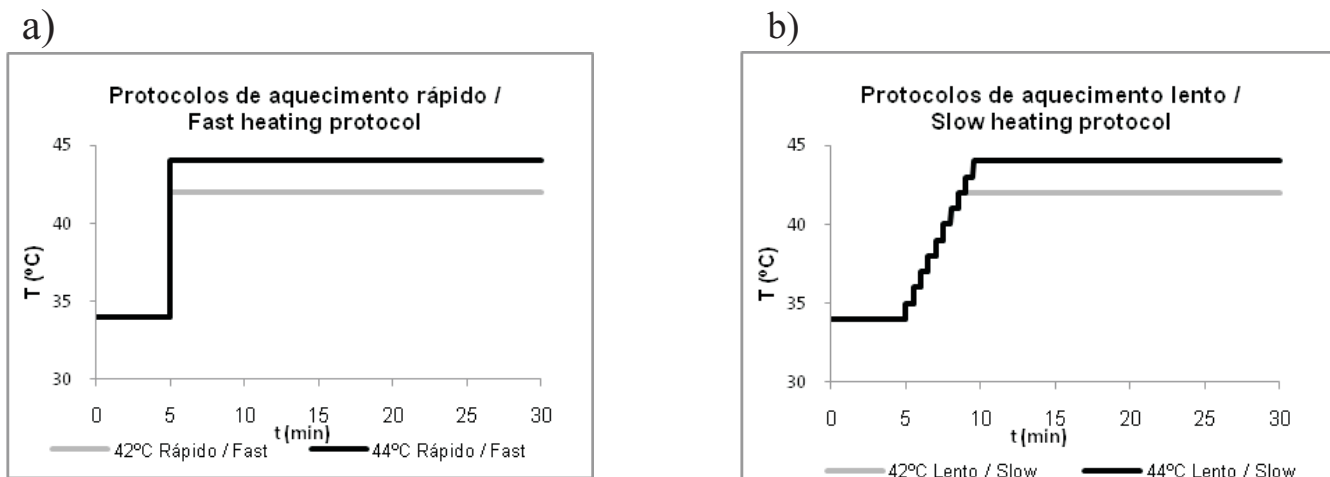
No final de cada protocolo foi ainda efectuado um pequeno questionário sobre o que o voluntário sentiu durante a experiência, dando-se particular relevância à existência ou não de dor.

### Protocols

Four heating protocols were defined – two fast heating procedures and two slow heating procedures, and digitally programmed (Periflux PF5020, Perimed, Sweden). All measurements were performed in different areas of the forearm avoiding higher superficial vessels (random selection of measuring site and forearm). All protocols started after a 34°C normalization of the skin, for 5 minutes, in order to guarantee similar basal conditions.

In the fast heating protocols, the temperature instantaneously increased to 42°C or 44°C (protocols F42 and F44). In the slow heating protocols, the temperature gradually increased (1°C every 30s) until 42°C or 44°C (Protocols S42 e S44). In both cases, once reached, the maximum temperature was maintained for 30 minutes. The temperature variation over the time, in all the protocols, is summarized in Figure 1.

At the end of each protocol, volunteers were asked to describe, in a questionnaire, the pain sensation felt during procedures.



**Figura 1** – a) Protocolos de aquecimento rápido (R42 e R44); b) Protocolos de aquecimento lento (L42 e L44).

**Figure 1** – a) Fast heating protocols (F42 and F44); b) Slow heating protocols (S42 e S44).

### Análise dos resultados

Para avaliar as diferenças entre os diversos protocolos foram definidos três momentos de avaliação: i) pico, ii) vale, e iii) *plateau*. O momento pico é obtido pela média de valores no máximo  $\pm 30$  segundos e o momento vale

### Data analysis

To evaluate the differences between protocols three moments were defined for data analysis - i) peak, ii) nadir and iii) *plateau*. The moment defined as peak is obtained by the mean values at the maximum  $\pm 30$

é a média de valores no mínimo  $\pm 30$  segundos. Nos casos em que não foi possível determinar os valores máximos e mínimos considerou-se como estimativa do pico a média de valores entre 2m40s  $\pm 30$  segundos (aquecimento rápido) ou 4m30s  $\pm 30$  segundos (aquecimento lento) após aquecimento; e como estimativa do vale a média de valores entre 4m50  $\pm 30$  segundos (aquecimento rápido) ou 6m34  $\pm 30$  segundos (aquecimento lento) após aquecimento. O momento plateau determinou-se com a média de valores entre os 22m30s  $\pm 30$  segundos após aquecimento. Calculou-se ainda a razão vale/pico (V/P) como sendo um valor matemático que permite distinguir o tipo de perfil obtido na resposta ao aquecimento local:

- Se  $V/P < 1$ , existe um vale na resposta microcirculatória, o que indica a existência um perfil bifásico;
- Se  $V/P > 1$ , não existe vale na resposta microcirculatória, o que indica um perfil monofásico.

Na análise estatística foram utilizados os programa MsExcell e SPSS 18.0; para a análise comparativa da razão vale/pico utilizou-se o teste de Wilcoxon, a um nível de confiança de 95%.

## Resultados

Na figura 2 é possível visualizar os resultados obtidos na resposta ao aquecimento local rápido e gradual, a 42 e 44°C. Os valores médios e respectivos desvios padrão dos momentos pico, vale e plateau para os diversos protocolos efectuados encontram-se resumidos na Tabela 1.

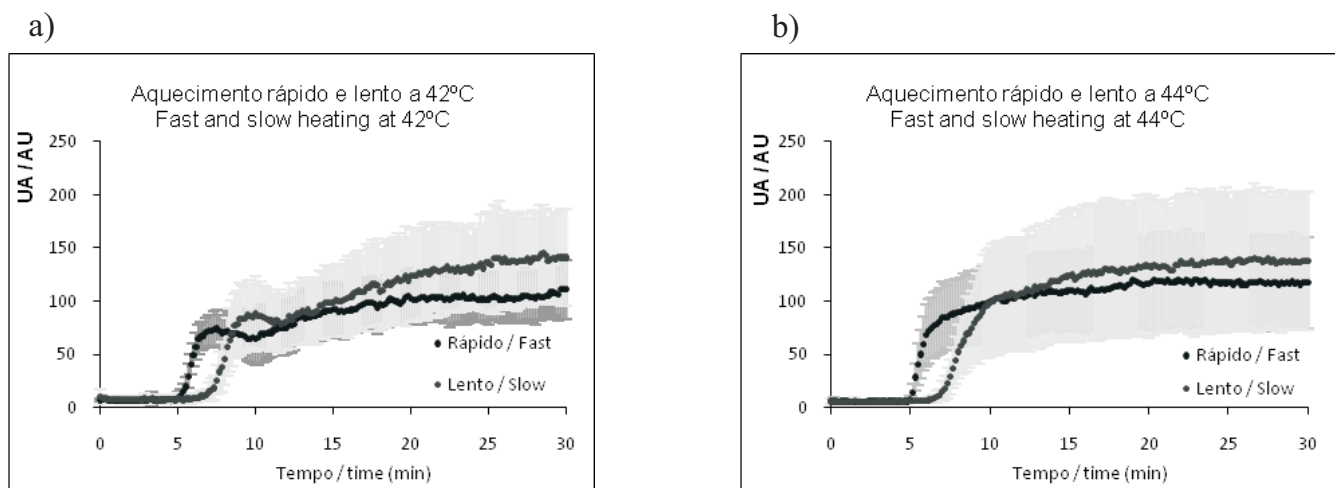
seconds. The moment nadir is the mean values at the minimum  $\pm 30$  seconds. In cases where the maximum and nadir values could not be exactly defined, estimation of the peak considered values obtained at 2m40s  $\pm 30$  seconds (in fast heating procedures) or 4m30s  $\pm 30$  seconds (in slow heating procedures) following heating, while the estimation of the nadir considered the mean values at 4m50  $\pm 30$  seconds (in fast heating procedures) or 6m34  $\pm 30$  seconds (slow heating procedures) following heating. The moment plateau was defined as the mean values obtained at 22m30s  $\pm 30$  seconds after heating started. The quotient nadir/peak (N/P) was also calculated as a mathematical value used to characterize the shape of the response:

- If  $N/P < 1$ , a nadir in the microcirculatory response was found, with a biphasic shape;
- If  $N/P > 1$ , no nadir in the microcirculatory response was present, with a monophasic shape.

Statistical analysis was performed using MsExcell 2007, and SPSS 18.0; for statistical comparisons of the nadir/peak values a Wilcoxon rank sign test was used and a confidence level of 95% adopted.

## Results

Figure 2 presents the results of the gradual and fast local heating response, obtained at 42 and 44°C. Mean values and standard deviation values obtained at peak, nadir and plateau in all the protocols are summarized in table 1.



**Figura 2** – Evolução do fluxo de sangue com a temperatura de aquecimento a) 42°C e b) 44°C. Média de 10 voluntários e respectivo desvio-padrão.

**Figure 2** – Blood flow evolution according with the heating temperature a) 42°C and b) 44°C. Mean and standard deviation from 10 volunteers

**Tabela 1** – Estatística descritiva e comparação das variáveis nas diferentes fases de resposta ao aquecimento local, para os dados obtidos em todos os protocolos - Valores de Fluxo de sangue (UA)

**Table 1** - Descriptive statistic and variable comparison the different phases of the local hiperemia response in all the protocols - Blood Flow values (AU)

Protocolos <i>Protocols</i>	Fases da resposta ao aquecimento local <i>Local heating response phases</i>					
	<i>Pico/Peak</i>		<i>Vale/Nadir</i>		<i>Plateau</i>	
	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>Média</i>	<i>DP</i>
	<i>Mean</i>	<i>+SD</i>	<i>Mean</i>	<i>+SD</i>	<i>Mean</i>	<i>+SD</i>
<b>R42 / F42</b>	73,71	16,22	63,60	22,62	104,11	22,68
<b>L42 / S42</b>	84,79	31,56	79,67	26,32	138,89	42,70
<b>R44 / F44</b>	87,77	31,19	98,78	35,24	117,61	43,30
<b>L44 / S44</b>	86,71	43,14	106,22	51,72	137,92	63,33

Na Tabela 2 é possível visualizar os valores V/P, assim como os perfis de resposta, para todos os protocolos efectuados. A análise comparativa (teste de Wilcoxon) da razão V/P entre os diversos métodos encontra-se resumida na Tabela 3.

In table 2 it is possible to observe the N/P values, and the corresponding curve shape of all the protocols. Comparative statistical analysis (Wilcoxon test) of the N/P parameter between the protocols was summarized in table 3.

**Tabela 2** – Razão vale/pico, tipo de perfil e resultados estatísticos em todos os protocolos.

**Table 2** - Nadir/Peak values, profile shape and statistical results in all protocols.

Protocolos <i>Protocols</i>	V/P   N/P <i>Média DP</i> <i>Mean+SD</i>	Perfil <i>Shape</i>	P value
<b>R42 / F42</b>	0,844 0,13	Bifásico / <i>Biphasic</i>	0,051
<b>L42 / S42</b>	0,951 0,066	Bifásico / <i>Biphasic</i>	
<b>R44 / F44</b>	1,124 0,071	Monofásico / <i>Monophasic</i>	0,050
<b>L44 / S44</b>	1,227 0,054	Monofásico / <i>Monophasic</i>	

**Tabela 2** – Razão vale/pico, tipo de perfil e resultados estatísticos em todos os protocolos.

**Table 2** - Nadir/Peak values, profile shape and statistical results in all protocols.

		<i>P value</i>		
		R42 /F42	L42 / S42	
<i>V/P</i>	<i>R44/ F44</i>	<b>0,012</b>	<i>L44/ S44</i>	<b>0,012</b>
<i>N/P</i>				

No aquecimento rápido (R42) verificou-se uma subida rápida da temperatura alcançando-se um máximo aos 2m40s  $\pm$  34s após o início do aquecimento, seguido de um vale com um mínimo aos 4m53s  $\pm$  24s, terminando num plateau. No aquecimento gradual (L42) obteve-se um perfil de resposta semelhante, mas a resposta aparece, como se esperava, mais tardiamente: o pico verifica-se só aos 4m29s  $\pm$  27s e o vale aos 6m34s  $\pm$  36s, após o início do aquecimento. Esta resposta bifásica pode ser verificada matematicamente através dos valores de razão vale/pico inferiores à unidade ( $V/P_{R42}=0,844 \pm 0,13$ ;  $V/P_{L42}=0,951 \pm 0,13$ ).

A 44°C, independentemente da velocidade de aquecimento, observou-se um perfil monofásico: aumento rápido do fluxo que estabiliza no plateau. Esta resposta monofásica pode ser demonstrada com os valores de razão vale/pico superiores à unidade:  $V/P_{R44}=1,124 \pm 0,071$  e  $V/P_{L44}=1,227 \pm 0,054$ .

Em termos estatísticos, verificou-se uma diferença significativa entre os protocolos a 42 e 44°C:  $p_{V/P,R42-R44}=0,012$ ;  $p_{V/P,L42-L44}=0,012$ , que vieram a confirmar o diferente tipo de resposta observado.

Relativamente ao questionário sensorial, que poderá indicar a activação de nociceptores, verificou-se que a maioria (8/10), sentiu um ligeiro aquecimento e/ou prurido nos protocolos de aquecimento rápido. No entanto, nos protocolos de aquecimento gradual, esta frequência diminuiu (2/10 para L42 e 5/10 para L44).

## Discussão

No aquecimento local da pele podem obter-se dois tipos de perfis - monofásico e bifásico, discriminados pelo valor da razão vale/pico. Na resposta ao aquecimento a 42°C o perfil bifásico encontra-se de acordo com os resultados de outros investigadores<sup>[4,5,7,29]</sup>, cujo mecanismo, embora não totalmente identificado, já se encontra aproximadamente descrito<sup>[4,5,7,12,13,22,25-31]</sup>. No aquecimento a 44°C foi observada uma resposta monofásica, em ambas as formas de aquecimento. Este perfil foi também obtido por outros investigadores<sup>[9,29,30]</sup> mas o seu mecanismo, ainda pouco esclarecido, não está provavelmente relacionado com o reflexo axonal<sup>[29]</sup>. Estes resultados sugerem que, apesar de existir uma redução na velocidade de aquecimento, esta não foi suficiente para evitar algum grau de activação dos nociceptores. De facto, nestas experiências, o aquecimento foi sempre sentido pelos voluntários e, nalguns casos, foi induzida uma sensação de prurido, o que indicia uma activação superior dos receptores da dor. Desta forma sugere-se que a velocidade de aquecimento é um dos factores que mais influência exerce sobre a forma da resposta da microcirculação local. Por outro lado, vários têm sido os investigadores<sup>[5,7,18,25-28]</sup> que relacionaram as fibras C, estimulados por capsaicina ou pelo calor, com o

In the fast heating protocol (F42) there is a fast increase of the temperature, that reaches a maximum at 2m 40s  $\pm$  34s after heating started, followed by a nadir with a minimum at 4m53s  $\pm$  24s, ending in a plateau. In the gradual heating protocol (S42) the shape is similar, but the response, as expected, is obtained with a delay. The peak is obtained at 4m29s  $\pm$  27s and the nadir at 6m34s  $\pm$  36s. This biphasic shape may be mathematically verified by the nadir/peak values that are lower than 1 ( $N/P_{F42}=0,844 \pm 0,13$ ;  $N/P_{S42}=0,951 \pm 0,13$ ).

At 44°C, the shape is monofasic in all types of heating procedure. Here we observe a fast flow increase that stabilizes in a plateau. This monophasic shape is confirmed by the nadir/peak values higher than 1 ( $N/P_{F44}=1,124 \pm 0,071$  e  $N/P_{S44}=1,227 \pm 0,054$ ).

Statistically, there is a significant difference between the 42 and 44°C protocols:  $p_{N/P,F42-F44}=0,012$ ;  $p_{N/P,S42-S44}=0,012$ , that confirm the different types of response observed.

From the sensorial questionnaire, we concluded that the majority of the volunteers (8/10) felt a slight heating/itching sensation in the fast heating protocols. However, in the gradual heating procedures this frequency clearly decreased (2/10 at S42 and 5/10 to S44).

## Discussion

In local heating procedures two types of profiles – monophasic and biphasic, were obtained, discriminated by the nadir/peak values. In the 42°C heating procedure, the biphasic shape was in accordance with other published results<sup>[4,5,7,29]</sup>, and the mechanism, although not completely identified, is already described<sup>[4,5,7,12,13,22,25-31]</sup>. At 44°C there was a monophasic response with both heating rates. This profile was also obtained by others<sup>[9,29,30]</sup>, but the mechanism is still not clear, although not related with the axonal reflex<sup>[29]</sup>. Results suggest that reduction in the heating rate velocity could not avoid some degree of nociceptive activation. In fact volunteers always referred feeling the heat in those experiments, and in some cases a itching sensation was also referred, which strongly draws our attention to a higher activation of pain receptors. These results suggest that the heating rate is one of the most relevant parameters that influence the local microcirculatory response. Also, several researchers<sup>[5,7,18,25-28]</sup> relate the C fibers, activated by the capsaicin or by the heat, with the initial blood flow increase in thermal hyperemia. Therefore it is also possible that the activation threshold of this fibers may shape the response (a strong activation could result in a monophasic shape, and a slight activation

aumento inicial do fluxo sanguíneo na hiperémia térmica. Por isso, é também provável que o grau de ativação destas fibras condicione o perfil de resposta (uma forte ativação resultaria numa resposta monofásica, enquanto que uma ligeira ativação resultaria numa resposta bifásica). No entanto, são necessários mais estudos para comprovar esta teoria.

### Conclusões

Os mecanismos fisiológicos envolvidos no aquecimento local da pele variam consoante a temperatura e velocidade de aquecimento utilizada, sugerindo o envolvimento de diferentes mecanismos de activação.

### Agradecimentos

Os autores expressam os seus agradecimentos aos voluntários.

could induce a biphasic one). However to confirm this hypothesis new studies must be developed.

### Conclusions

Physiological mechanisms involved in the local skin heating, change with temperature and heating rate, suggesting the involvement of various activation mechanisms.

### Acknowledgments

The authors would like to express their thanks to all volunteers.

### Referências / References

- [1].Kellogg, D.L., Jr., J.L. Zhao, and Y. Wu, Roles of nitric oxide synthase isoforms in cutaneous vasodilation induced by local warming of the skin and whole body heat stress in humans. *J Appl Physiol*, 2009. 107(5): p. 1438-44.
- [2].Kvandal, P., A. Stefanovska, M. Veber, H.D. Kvernmo, and K.A. Kirkeboen, Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines. *Microvasc Res*, 2003. 65(3): p. 160-71.
- [3].Hamdy, O., K. Abou-Elenin, F.W. LoGerfo, E.S. Horton, and A. Veves, Contribution of nerve-axon reflex-related vasodilation to the total skin vasodilation in diabetic patients with and without neuropathy. *Diabetes Care*, 2001. 24(2): p. 344-9.
- [4].Kellogg, D.L., Jr., In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. *J Appl Physiol*, 2006. 100(5): p. 1709-18.
- [5].Golay, S., C. Haerberli, A. Delachaux, L. Liaudet, P. Kucera, B. Waeber, and F. Feihl, Local heating of human skin causes hyperemia without mediation by muscarinic cholinergic receptors or prostanoids. *J Appl Physiol*, 2004. 97(5): p. 1781-6.
- [6].Lindstedt, I.H., M.L. Edvinsson, and L. Edvinsson, Reduced responsiveness of cutaneous microcirculation in essential hypertension--a pilot study. *Blood Press*, 2006. 15(5): p. 275-80.
- [7].Charkoudian, N., Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin Proc*, 2003. 78(5): p. 603-12.
- [8].Boignard, A., M. Salvat-Melis, P.H. Carpentier, C.T. Minson, L. Grange, C. Duc, F. Sarrot-Reynauld, and J.L. Cracowski, Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Res Ther*, 2005. 7(5): p. R1103-12.
- [9].Rossi, M. and A. Carpi, Skin microcirculation in peripheral arterial obliterative disease. *Biomed Pharmacother*, 2004. 58(8): p. 427-31.
- [10].Medow, M.S., C.T. Minson, and J.M. Stewart, Decreased microvascular nitric oxide-dependent vasodilation in postural tachycardia syndrome. *Circulation*, 2005. 112(17): p. 2611-8.
- [11].Berghoff, M., M. Kathpal, S. Kilo, M.J. Hilz, and R. Freeman, Vascular and neural mechanisms of ACh-mediated vasodilation in the forearm cutaneous microcirculation. *J Appl Physiol*, 2002. 92(2): p. 780-8.
- [12].Kellogg, D.L., Jr., Y. Liu, I.F. Kosiba, and D. O'Donnell, Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol*, 1999. 86(4): p. 1185-90.
- [13].Kellogg, D.L., Jr., J.L. Zhao, and Y. Wu, Endothelial nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 295(1): p. H123-9.



- [14].Kellogg, D.L., Jr., J.L. Zhao, and Y. Wu, Neuronal nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo. *J Physiol*, 2008. 586(3): p. 847-57.
- [15].Kellogg, D.L., Jr., C.G. Crandall, Y. Liu, N. Charkoudian, and J.M. Johnson, Nitric oxide and cutaneous active vasodilation during heat stress in humans. *J Appl Physiol*, 1998. 85(3): p. 824-9.
- [16].Kellogg, D.L., Jr., G.J. Hodges, C.R. Orozco, T.M. Phillips, J.L. Zhao, and J.M. Johnson, Cholinergic mechanisms of cutaneous active vasodilation during heat stress in cystic fibrosis. *J Appl Physiol*, 2007. 103(3): p. 963-8.
- [17].Kellogg, D.L., Jr., P.E. Pergola, K.L. Piest, W.A. Kosiba, C.G. Crandall, M. Grossmann, and J.M. Johnson, Cutaneous active vasodilation in humans is mediated by cholinergic nerve cotransmission. *Circ Res*, 1995. 77(6): p. 1222-8.
- [18].Roosterman, D., T. Goerge, S.W. Schneider, N.W. Bunnett, and M. Steinhoff, Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev*, 2006. 86(4): p. 1309-79.
- [19].Wilkins, B.W., B.J. Wong, N.J. Tublitz, G.R. McCord, and C.T. Minson, Vasoactive intestinal peptide fragment VIP10-28 and active vasodilation in human skin. *J Appl Physiol*, 2005. 99(6): p. 2294-301.
- [20].Kirschstein, T., D. Busselberg, and R.D. Treede, Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett*, 1997. 231(1): p. 33-6.
- [21].Bonelli, R.M. and P. Koltringer, Autonomic nervous function assessment using thermal reactivity of microcirculation. *Clin Neurophysiol*, 2000. 111(10): p. 1880-8.
- [22].Holzer, P., Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol*, 1998. 30(1): p. 5-11.
- [23].Brain, S.D. and A.D. Grant, Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*, 2004. 84(3): p. 903-34.
- [24].Yonehara, N., J.Q. Chen, Y. Imai, and R. Inoki, Involvement of substance P present in primary afferent neurones in modulation of cutaneous blood flow in the instep of rat hind paw. *Br J Pharmacol*, 1992. 106(2): p. 256-62.
- [25].Charkoudian, N., J.H. Eisenach, J.L. Atkinson, R.D. Fealey, and M.J. Joyner, Effects of chronic sympathectomy on locally mediated cutaneous vasodilation in humans. *J Appl Physiol*, 2002. 92(2): p. 685-90.
- [26].Vinik, A.I., T. Erbas, T.S. Park, K.K. Pierce, and K.B. Stansberry, Methods for evaluation of peripheral neurovascular dysfunction. *Diabetes Technol Ther*, 2001. 3(1): p. 29-50.
- [27].Pergola, P.E., D.L. Kellogg, Jr., J.M. Johnson, W.A. Kosiba, and D.E. Solomon, Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin. *Am J Physiol*, 1993. 265(3 Pt 2): p. H785-92.
- [28].Arildsson, M., G.E. Nilsson, and T. Stromberg, Effects on skin blood flow by provocation during local analgesia. *Microvasc Res*, 2000. 59(1): p. 122-30.
- [29].Pinto, P.M., S., Rodrigues, L., Assessment of the effect of temperature on the dynamics of cutaneous microcirculatory response. *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 2008. 5(1): p. 61-67.
- [30].Pinto, P., Félix, T., Rodrigues, L., About the impact of the transdermal application of a NO sintetase inhibitor (L-NAME) –a preliminary approach. *Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*, 2008. 6(2): p. 246-252.
- [31].Houghton, B.L., J.R. Meendering, B.J. Wong, and C.T. Minson, Nitric oxide and noradrenaline contribute to the temperature threshold of the axon reflex response to gradual local heating in human skin. *J Physiol*, 2006. 572(Pt 3): p. 811-20.
- [32].Hodges, G.J., W.A. Kosiba, K. Zhao, and J.M. Johnson, The involvement of norepinephrine, neuropeptide Y, and nitric oxide in the cutaneous vasodilator response to local heating in humans. *J Appl Physiol*, 2008. 105(1): p. 233-40.
- [33].Wissler, E.H., A quantitative assessment of skin blood flow in humans. *Eur J Appl Physiol*, 2008. 104(2): p. 145-57.
34. Stephens, D.P., N. Charkoudian, J.M. Benevento, J.M. Johnson, and J.L. Saumet, The influence of topical capsaicin on the local thermal control of skin blood flow in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 281(3): p. R894-901.
- [35].McCord, G.R. and C.T. Minson, Cutaneous vascular responses to isometric handgrip exercise during local heating and hyperthermia. *J Appl Physiol*, 2005. 98(6): p. 2011-8.
- [36].Stewart, J., A. Kohen, D. Brouder, F. Rahim, S. Adler, R. Garrick, and M.S. Goligorsky, Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 287(6): p. H2687-96.
- [37].World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Int Bioethique*, 2004. 15(1): p. 124-9.