

Cold-Induced Skin Perfusion Adaptive Responses: Comparing ICE and PORH Mechanisms In Vivo

Respostas adaptativas da perfusão cutânea induzidas pelo frio: Comparação dos Mecanismos AEG e HRPO In Vivo

Joana Caetano ^{1,2} , Pedro de la Villa Polo ³ , José Delgado Alves ^{1,4} , & Luís Monteiro Rodrigues ²  

Keywords: Reactive hyperemia, microcirculation, skin temperature, ice cooling, laser Doppler flowmetry

Palavras-chave: Hiperemia reactiva, microcirculação, temperatura da pele, arrefecimento por gelo, fluxometria laser Doppler

To Cite:

Caetano, J. et. al (2025) Evaluating the utility of ice cooling exposure (ICE) as vascular challenger in vivo. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(1), 94-105.
 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.1.355>

1 - Systemic Autoimmune Diseases Unit, Department of Medicine IV, Fernando Fonseca Hospital, Amadora, Portugal

2 - CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Campo Grande 376, Lisboa Portugal

3 - Systems Biology Unit & Escuela Doctorado, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud | Alcalá de Henares, Madrid Espana

4 - Immune response and vascular disease, iNOVA4Health, NOVA Medical School/Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

Received / Recebido: 22/4/2025
Accepted / Aceite: 30/5/2025

Abstract

Ice cooling exposure (ICE) is an interesting, but little explored, technique used to examine human peripheral microcirculatory adaptive mechanisms. In this study, we compare in vivo perfusion changes assessed by laser Doppler flowmetry (LDF) during post-occlusive reactive hyperemia (POHR) and ICE procedures. Eleven healthy women, 29.3±7.3 years old, were selected and sequentially submitted to PORH and ICE procedures in one randomly selected upper limb. Blood perfusion and skin temperature were continuously measured in both hands during baseline (phase I) challenge (phase II) and recovery (phase III). Procedures respected all clinical research principles and were previously submitted to the institutional ethics committee.

PORH and ICE evoked significant decreases in skin perfusion in phase II followed by reperfusion in the intervention limb, although with different velocities. Similar significant responses were obtained in the contralateral limbs. Correlation among variables could not be found, except between LDF and temperature signals across phases. Results suggest that ICE is better tolerated than POHR when used with the same objective. More studies are needed to confirm if reflexes elicited by these approaches are equivalent and equally suitable for application in vascular medicine.

Resumo

O arrefecimento por exposição pelo gelo (AEG) é uma técnica interessante embora pouco explorada para examinar os mecanismos adaptativos da microcirculação periférica humana. Neste estudo, comparamos as alterações de perfusão in vivo avaliadas por fluxometria laser Doppler (LDF) envolvendo a hiperemia reactiva pós-oclusão (HRPO) e o AEG. Onze mulheres saudáveis, com 29,3±7,3 anos de idade, foram seleccionadas e submetidas sequencialmente aos procedimentos de HRPO e AEG num membro superior seleccionado aleatoriamente. A perfusão sanguínea e a temperatura da pele foram medidas continuamente em ambas as mãos durante a linha de base (fase I), no desafio (fase II) e na recuperação (fase III). Os procedimentos respeitaram todos os princípios de investigação clínica e foram previamente submetidos ao comité de ética institucional. A HRPO e o AEG evocaram diminuições significativas na perfusão da pele na fase II, seguidas de reperfusão no membro intervencionado, embora com velocidades diferentes. Respostas significativas semelhantes foram obtidas nos membros contralaterais. Não foi possível encontrar correlação entre as variáveis, exceto entre os sinais de LDF e temperatura ao longo das fases. Os resultados sugerem que o ICE é melhor tolerado do que o POHR quando utilizado com o mesmo objetivo. São necessários mais estudos para confirmar se os reflexos provocados por estas abordagens são equivalentes e igualmente adequados para exploração em medicina vascular.

Introduction

Vascular disease frequently involves microvascular function impairment, affecting muscular and endothelial functions, including endothelium-dependent processes such as vasodilation and microvascular remodeling (1). Hence, the characterization of microcirculatory physiology in vivo and its adaptive capacities regarding controlled challenges can add valuable knowledge regarding the pathophysiological mechanisms involved (2).

Skin microcirculation has been explored as a suitable model to study microvascular function, considering its essential roles in thermoregulation and cardiovascular integration, and it is seen as a practical and easily accessible model to apply in multiple in vivo studies (3). The development of various, mostly optical, non-invasive technologies to quantitatively assess microcirculatory-related variables have facilitated this option (4). The use of laser Doppler flowmetry (LDF) has become more popular in recent years and is currently regarded as the gold standard for the assessment of human in vivo vascular function. Challenges involved in its interpretation remain. Several other sophisticated technologies have also been developed, but these might still be considered exploratory (5,6).

In this direction, several methods have been proposed to study human *in vivo* microcirculatory function and vascular adaptive mechanisms in the presence of a controlled challenger such as hyperemia, local heating/cooling, or by known vasoactive agents (2,7). Although the post-occlusive reactive hyperemia (POHR) became one of the most referred procedures, its application to clinical practice and research has been difficult. The mechanisms involved are still unclear, and the maneuver itself is not "patient-friendly," involving significant discomfort, especially in the presence of peripheral pathology (8,9). Alternative methods such as skin cooling as a challenger to promote reactive hyperemia have not been sufficiently explored (10,11), although it has been recognized as a more physiological approach. Furthermore, controlled cooling allows mimicking of environmental exposure to cold and provides direct clinical correlations with unique expressions of vascular impairment such as the Raynaud's phenomenon, where cold acts as the main trigger (12).

Introdução

As doenças vasculares envolvem frequentemente um comprometimento da função microvascular, afetando as funções muscular e endotelial, incluindo processos dependentes do endotélio, como a vasodilatação e a remodelação microvascular (1). Assim, a caracterização da fisiologia da microcirculação in vivo e das suas capacidades de adaptação a desafios controlados pode acrescentar conhecimentos valiosos sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos (2).

A microcirculação cutânea tem sido explorada como um modelo adequado para estudar a função microvascular tendo em conta o seu papel essencial na termorregulação e na integração cardiovascular, sendo vista como um modelo prático e facilmente acessível para aplicação em múltiplos estudos in vivo (3). O desenvolvimento de várias tecnologias não-invasivas, maioritariamente de base óptica, para avaliar quantitativamente as variáveis relacionadas com a microcirculação, facilitou esta opção (4). A utilização da fluxometria por laser Doppler (LDF) tornou-se mais popular nos últimos anos e é atualmente considerada como o padrão de ouro para a avaliação da função vascular humana in vivo. A sua interpretação continua a ser um desafio. Foram também desenvolvidas várias outras tecnologias sofisticadas, mas estas podem ainda ser consideradas exploratórias (5,6).

Neste sentido, foram propostos vários métodos para estudar a função microcirculatória humana in vivo e os mecanismos de adaptação vascular na presença de um desafio controlado, como a hiperemia, o aquecimento/arrefecimento local ou agentes vasoativos conhecidos (2,7). Embora a hiperemia reactiva pós-oclusiva (HRPO) se tenha tornado um dos procedimentos mais referidos, a sua aplicação à prática e investigação clínicas não tem sido simples. Os mecanismos envolvidos ainda não são claros, e a manobra em si não é "amigável" envolvendo por vezes um desconforto significativo, especialmente na presença de patologia periférica (8,9). Métodos alternativos, como o arrefecimento da pele como desafiador para promover a hiperemia reativa, não foram suficientemente explorados (10,11), embora tenham sido reconhecidos como uma abordagem mais fisiológica. Além disso, o arrefecimento controlado permite imitar a exposição ambiental

To explore these views with a special focus on the potential interest of cold exposure as a challenger to look deeper into peripheral vascular physiology, the present study compares LDF perfusion changes obtained with POHR and ICE procedures under standardized conditions in a cohort of healthy participants. A secondary goal is also to define optimized protocols for the application of ICE with this purpose.

Materials and Methods

Eleven healthy women, mean age of 29.3 ± 7.3 years old were selected following general inclusion – non-inclusion criteria common to this type of study. The only restriction was not to consume caffeine or alcohol at least 24 hours before experiments. All procedures, including an informed written consent, were developed in conformity with the Declaration of Helsinki and its subsequent amendments (13). Measurements were performed by the same investigator, in a room with controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), and humidity (40-60%). The experimental protocol included two sequential procedures - PORH and ICE - in a randomly chosen order, in a randomly chosen limb. The contralateral limb was used as control, and a minimum washout period of 30 minutes between protocols was maintained.

The PORH protocol consisted of phase I – stabilization (10 minutes), phase II – challenge with a cuff pressure (200 mmHg for five minutes), and phase III – recovery after deflation (ten minutes). The ICE respected the same procedural sequence, where the phase II challenge was the contact of the palmar aspect of one hand with an ice pad, covered by a sheet of cotton for patient comfort, for ten minutes, followed by phase III recovery after removal of the ice pad.

The LDF signal was obtained using a MOOR system (MoorVMS-LDF, by Moor Instruments, Devon, UK). Sensors were placed on the ventral side of the 3rd finger in each hand, enabling continuous acquisition (32Hz) of perfusion, measured in arbitrary blood

ao frio, fornecendo correlações clínicas diretas com expressões únicas de comprometimento vascular, como o fenómeno de Raynaud, em que o frio actua como o principal desencadeador (12).

De forma a explorar estas perspectivas, colocando um ênfase especial no potencial interesse da exposição ao frio como desafio para aprofundar a fisiologia vascular periférica, este estudo compara as alterações de perfusão registadas com LDF obtidas com os procedimentos HRPO e AEG em condições padronizadas numa coorte de participantes saudáveis. Um objetivo secundário inclui definir protocolos otimizados para a aplicação do AEG com essa finalidade.

Materiais e Métodos

Foram seleccionadas 11 mulheres saudáveis, com uma idade média de $29,3 \pm 7,3$ anos, de acordo com os critérios gerais de inclusão e não inclusão comuns a este tipo de estudo. A única restrição imposta foi não consumir cafeína ou álcool pelo menos 24 horas antes das experiências. Todos os procedimentos, incluindo o consentimento informado por escrito, foram aplicados em conformidade com a Declaração de Helsínquia e as suas alterações posteriores (13). As medições foram realizadas pelo mesmo investigador, numa sala com temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e humidade (40-60%) controladas. O protocolo experimental incluiu dois procedimentos sequenciais - HRPO e AEG em sequencia aleatória, num membro escolhido também casualmente (utilizado como controlo o membro contralateral), com um período mínimo de *washout* entre protocolos de 30 minutos.

O protocolo de HRPO incluiu uma fase I – de estabilização (10 minutos), fase II – de desafio com a manga de pressão (200 mmHg por 5 minutos) e a fase III - recuperação após deflação (10 minutos). O AEG respeitou o mesmo faseamento, sendo que o desafio da fase II consistiu no contacto da face palmar de uma mão com uma superfície gelada coberta por um pano de algodão, para conforto do doente, durante 10 minutos, seguido da fase III - recuperação após remoção da superfície de gelo.

O sinal de LDF foi obtido através dum sistema MOOR (MoorVMS-LDF, da Moor Instruments, Devon, RU). Os sensores foram colocados na face ventral do terceiro dedo de cada mão, permitindo a aquisição contínua (32Hz) da perfusão, medida em unidades arbitrárias

perfusion units (BPUs) (14,15,16), along with continuous acquisition of skin surface temperature. (Figure 1).

Data was analyzed using Prism 8 software. Normality was assessed using the Shapiro-Wilk test (2025 GraphPad Software, Microsoft UK). Median values of LDF, skin temperature, and hemodynamic signals at the different frequency bands were analyzed in each phase. The Wilcoxon signed-rank test for related samples was used for phase comparison, with a confidence interval of 95%. For comparison between measures of the three phases, the Kruskal-Wallis test was used. The coefficient of variability of LDF and temperature signals was calculated as the ratio of standard deviation over mean, expressed as percentage (%). Spearman's correlation analysis of LDF values and temperature was performed. For all tests, a $p < 0.05$ was considered significant.

Results

The PORH greatly reduced the LDF signal amplitude during cuff insufflation (200 mmHg), followed by significant hyperemia after cuff deflation (Figure 2- D and F). The ice-cooling protocol resulted in significant decreases in skin temperature and perfusion, followed by reperfusion after ceasing ice contact (Figure 2 - A and C). These changes in perfusion were statistically significant between phases I and II ($p < 0.001$) and

de perfusão sanguínea (BPUs) (14,15,16), juntamente com a aquisição contínua da temperatura da superfície da pele (Figura 1).

Os dados foram analisados com o software Prism 8 (2025 GraphPad Software, Microsoft RU). A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foram analisadas as medianas dos valores de LDF, temperatura da pele e sinais hemodinâmicos nas diferentes bandas de frequência em cada fase. Para a comparação entre as fases, foi utilizado o Wilcoxon signed-rank teste para amostras emparelhadas, com um intervalo de confiança de 95%. Para comparação entre as medidas das três fases, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. O coeficiente de variabilidade dos sinais de LDF e temperatura foi calculado como a razão entre o desvio padrão e a média, expresso em percentagem (%). Foi efectuada a análise de correlação de Spearman entre os valores de LDF e a temperatura. Para todos os testes, foi adoptado um $p < 0,05$.

Resultados

A HRPO reduziu muito a amplitude do sinal LDF durante a insuflação da manga (200 mmHg) seguida de uma hiperemia significativa após a libertação do ar (Figura 2 - D e F). O protocolo de arrefecimento com gelo provocou diminuições significativas da temperatura e da perfusão da pele, seguidas de reperusão após cessação do contacto com o gelo (Figura 2 - A e C). Essas alterações de perfusão mostraram ser estatisticamente significativas entre as

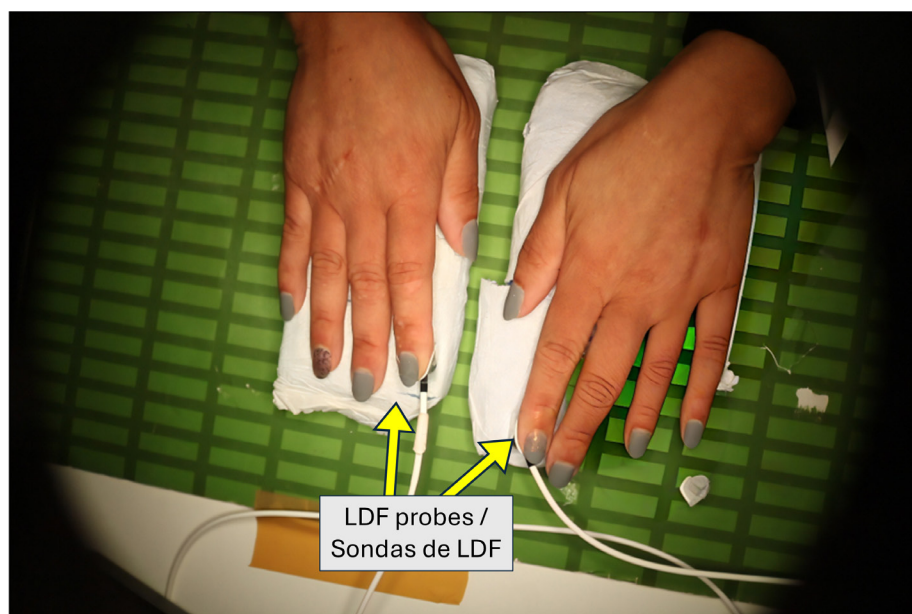


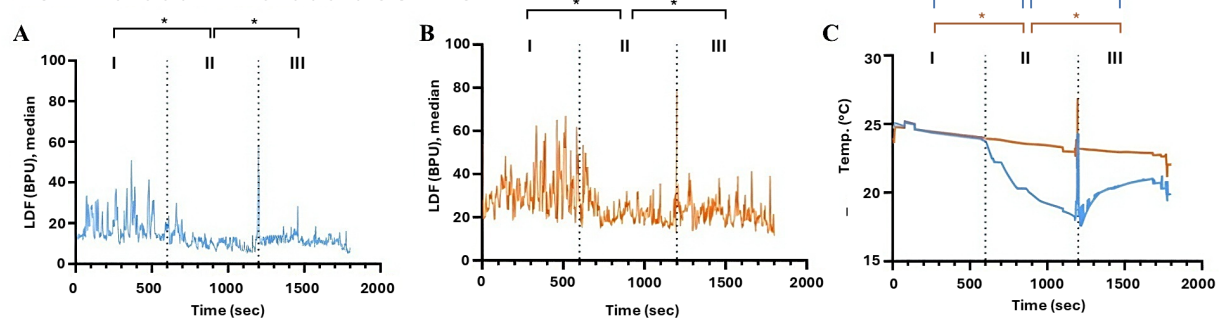
Figure 1 - Experimental set up for ICE in vivo data acquisition.

Figura 1 - Instalação experimental para aquisição de dados AGE in vivo.

phases II and III ($p<0.001$) in both protocols. There was a significant statistical difference ($p<0.001$) between the measures from the three phases in both ipsilateral and contralateral limbs. Similar responses were observed in the contralateral limb during both protocols but with lower amplitudes (Figure 2 – B, C, E, and F), except for perfusion measures between phases II and III of the PORH protocol. The median values of laser Doppler flowmetry and skin temperature during both protocols are presented in Table 1. There was no correlation in perfusion during phase II or phase III between both protocols, except for LDF values during phase II in the ipsilateral arm (Table 2). The variability of LDF measures during phase II with the ICE was lower (ipsilateral: 18.03%; contralateral: 18.93%), compared to PORH (ipsilateral: 62.9%; contralateral:

fases I e II ($p<0.001$) e entre as fases II e III ($p<0.001$) em ambos os protocolos. Houve diferença estatística significativa ($p<0.001$) entre as medidas das três fases, tanto no membro ipsilateral quanto no contralateral. No membro contralateral foram observadas respostas semelhantes em ambos os protocolos, porém com amplitudes menores (Figura 2 - B, C, E e F), com exceção das medidas de perfusão entre as fases II e III do protocolo HRPO. Os valores medianos fluxometria de laser Doppler e da temperatura da pele durante os dois protocolos são apresentados na Tabela 1. Não houve correlação na perfusão durante a fase II ou fase III entre os dois protocolos, exceto para os valores de LDF durante a fase II no braço ipsilateral (Tabela 2). A variabilidade das medidas de LDF durante a fase II com o AEG foi menor (ipsilateral: 18,03%; contralateral: 18,93%), quando comparada com a HRPO (ipsilateral: 62,9%; contralateral: 29,2%).

ICE Protocol / Protocolo de AEG



POHR Protocol / Protocolo de HRPO

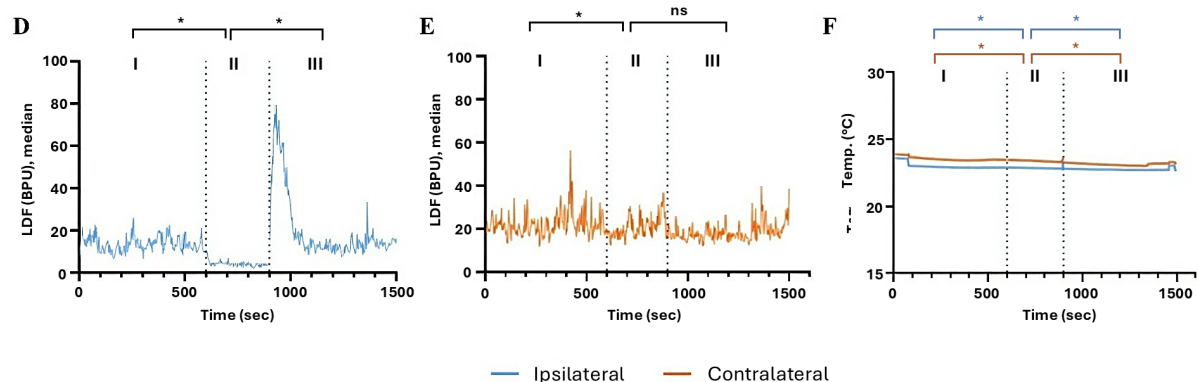


Figure 2 - LDF perfusion and temperature changes in ipsilateral (blue) and contralateral (orange) limbs during application of ice-cooling (A – LDF measures in the ipsilateral limb, B – LDF measurements in the contralateral limb, C – temperature measurements in ipsilateral and contralateral limbs) and post-occlusive reactive hyperemia (D – LDF measurements in the ipsilateral limb, E – LDF measurements in the contralateral limb, F – temperature measurements in the ipsilateral and contralateral limbs) protocols.

Figura 2 - Alterações da perfusão e da temperatura do LDF nos membros ipsilateral (azul) e contralateral (laranja) durante a aplicação do arrefecimento por gelo (A - medidas do LDF no membro ipsilateral, B - medidas do LDF no membro contralateral, C - medidas de temperatura nos membros ipsilateral e contralateral) e hiperemia reactiva pós-oclusiva (D - medidas de LDF no membro ipsilateral, E - medidas de LDF no membro contralateral, F - medidas de temperatura nos membros ipsilateral e contralateral).

Table 1 - Laser doppler flowmetry and skin temperature data during ICE and PORH execution protocols (n=11) *

Tabela 1 - Dados de fluxometria doppler a laser e temperatura da pele durante os protocolos de execução AEG e HRPO (n=11) *

	ICE Protocol / AEG Protocolo					PORH Protocol / HRPO Protocolo			
	Ipsilateral		Contralateral			Ipsilateral		Contralateral	
	LDF (BPU)	Temp. (°C)	LDF (BPU)	Temp. (°C)		LDF (BPU)	Temp. (°C)	LDF (BPU)	Temp. (°C)
phase I / fase I	50.1 (23.3; 72.1)	25.8 (24.3; 26.1)	74.0 (30.7; 103.0)	26.1 (24.6; 26.3)		58.2 (20.1; 84.0)	24.4 (24.2; 25.1)	64.9 (31.5; 83.3)	25.0 (24.9; 25.7)
phase II / fase II	43.8 (30.2; 88.2)	21.4 (20.2; 25.0)	52.7 (28,9; 97.2)	25.0 (24.0; 26.7)		6.6 (3.4; 43.0)	24.0 (23.4; 24.4)	51.2 (21.2; 76.7)	24.7 (24.6; 25.5)
phase III / fase III	39.3 (6.1; 69.6)	21.6 (17.0; 35.3)	59.5 (14.9; 85.5)	24.5 (21.6; 24.6)		74.1 (21.2; 158.4)	24.3 (23.6; 25.3)	54.6 (20.5; 80.0)	24.6 (24.4; 25.2)

*Values expressed as medians (minimum; maximum) / *Valores expressos como medianas (mínimo; máximo)

Table 2 - Spearman's correlation between LDF values and temperature during phases II and III in ipsilateral and contralateral arms.

Tabela 2 - Correlação de Spearman entre os valores de LDF e a temperatura durante as fases II e III nos braços ipsilateral e contralateral.

ICE vs PORH / AEG vs HRPO	IPSILATERAL		CONTRALATERAL	
	phase II / fase II	phase III / fase III	phase II / fase II	phase III / fase III
Spearman's correlation coefficient (rs) / Coeficiente de correlação de Spearman (rs)	0.563	0.053	0.078	-0.015
95% Confidence Interval / Intervalo de confiança de 95%	0.469 to 0.645	-0.074 to 0.179	-0.104 to 0.256	-0.143 to 0.112
p-value / valor-p	<0.001	0.4	0.384	0.806

29.2%). For temperature measures, the coefficient of variability was equally lower with both protocols (ICE – ipsilateral: 6.1%, contralateral: 1.9%; PORH – ipsilateral: 1.1%, contralateral: 0.5%).

A significant correlation between LDF and temperature signals across phases and limbs was observed (POHR: Spearman's correlation coefficient (rs) = 0.633 (p < 0.001); cold challenge: rs = 0.820 (p<0.001)).

The minimal duration of ice contact necessary for a significant difference in temperature and perfusion measures between the baseline (phase I) and the challenge (phase II) across limbs was calculated and set at 3 minutes (Wilcoxon test, p<0.01) (Figure 3).

Para as medidas de temperatura, o coeficiente de variabilidade foi igualmente menor com ambos os protocolos (AEG - ipsilateral: 6,1%, contralateral: 1,9%; HRPO - ipsilateral: 1,1%, contralateral: 0,5%).

Observámos uma correlação significativa entre os sinais de LDF e de temperatura entre as fases e os membros (HRPO: coeficiente de correlação de Spearman (rs) = 0,633 (p < 0,001); AEG: rs = 0,820 (p < 0,001)).

A duração mínima de contacto com o gelo necessária para uma diferença significativa nas medidas de temperatura e perfusão entre a linha de base (fase I) e o desafio (fase II) em todos os membros foi calculada e fixada em 3 minutos (teste de Wilcoxon, p < 0,01) (Figura 3).

Discussion

PORH is believed to result from the transitory ischemia produced by the cuff occlusion. Therefore, a decrease in the vasodilation following the cuff deflation has been associated with local microcirculatory impairment (17-20). However, our research consistently showed that this hyperemia could also be observable and measurable in the contralateral non-challenged limb, not depending on ischemia. As illustrative examples, these were detected with a short-duration light-intensity massage (21) as with the venoarteriolar reflex (22) in the lower and in upper limbs (23). These

Discussão

Em geral, o mecanismo que explica a HRPO continua a ser muito associado à isquemia transitória produzida pela oclusão conseguida com a manga de pressão. Por essa razão, a diminuição da intensa resposta vasodilatadora que deve seguir-se à deflação da manga tem sido associada ao comprometimento da microcirculação local (17-20). No entanto, a nossa investigação mostrou consistentemente que esta hiperemia também pode ser observável e mensurável no membro contralateral não desafiado, não dependendo portanto da isquemia. Como

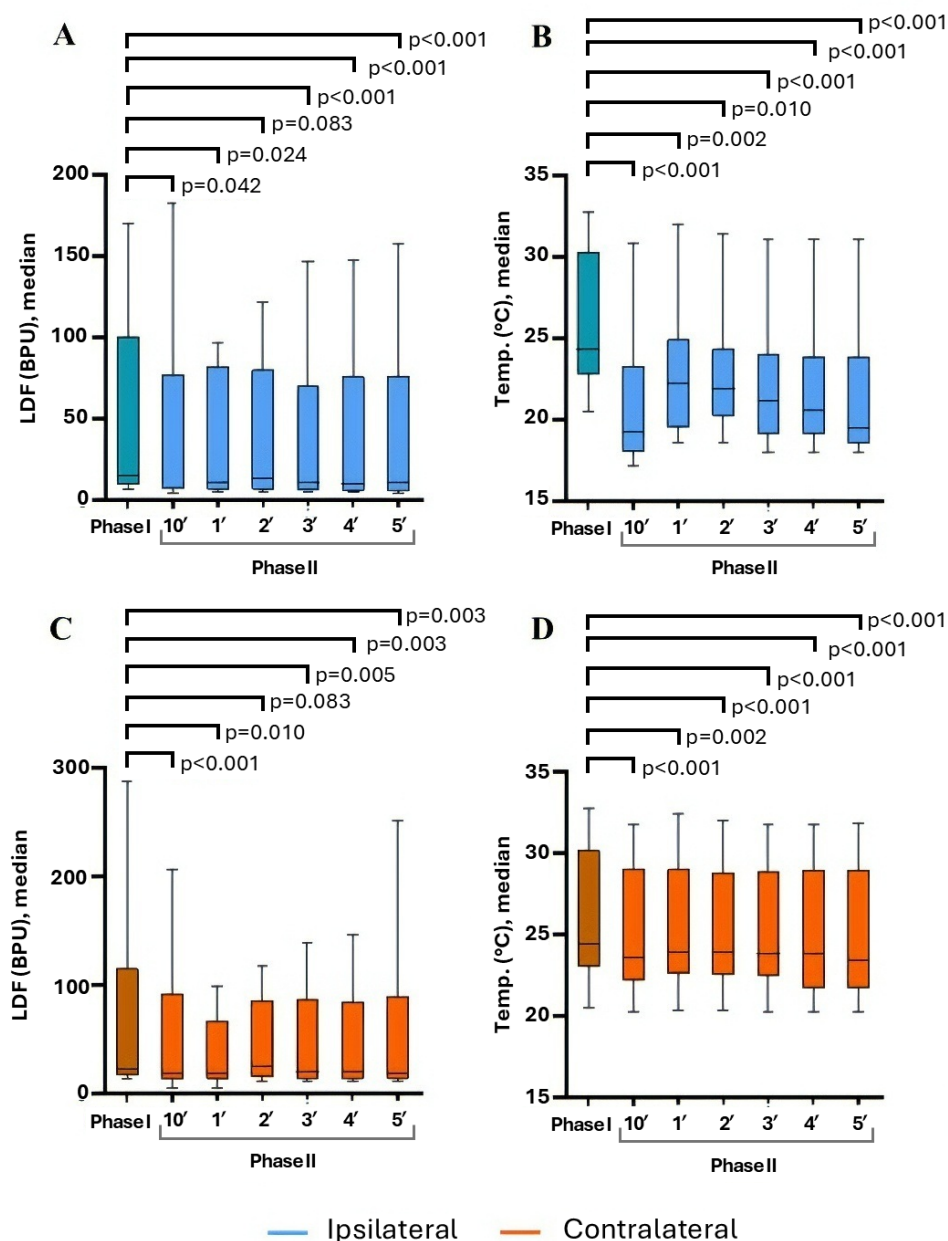


Figure 3 - Differences in perfusion and temperature measurements between the baseline (phase I) and the challenge (phase II) across limbs (Wilcoxon test, $p < 0.01$) during application of ice-cooling.

Figura 3 - Diferenças nas medidas de perfusão e temperatura entre a linha de base (fase I) e o desafio (fase II) nos membros (teste de Wilcoxon, $p < 0,01$) durante a aplicação do arrefecimento por gelo.

observations lead us to conclude that we were not observing a local response, but rather at a centrally mediated complex response with multiple sensors and effectors needing further clarification (24).

Our approach indicates that ICE results in a similar phenomenon where an initial vasoconstriction, locally induced by contact with the ice pad, is sustained by a vasoconstrictor (autonomic) outflow also seen in the contralateral hand which persists until the challenge stops. A reperfusion period takes place at this stage as observed with other challengers, including PORH. It has been accepted that reactive hyperemia indicates the reperfusion response to a brief period of ischemia induced by arterial occlusion (25,26). However, our data contradicts this view since (a) ischemia cannot be present when a 0 perfusion is not achieved and (b) as shown, the ice-related vasoconstriction and reperfusion observed after ICE also cannot be related with ischemia. Both phases (phases II and III) of these two procedures seem to lead to similar results. However, the mechanisms involved in the hypoperfusion and in the reperfusion and recovery phases with PORH and ICE have different timings, suggesting they are different, and no significant perfusion correlations could be found between the two procedures.

ICE has been reported to involve less discomfort and be better tolerated than PORH (26), and local cooling has been reported with better reproducibility than PORH (9). The variability of LDF measurements was reduced in the ICE protocol compared with the PORH, which might result from fewer (signal) artifacts of movement, including the lack of cuff manipulation as participant movement, improving assay reliability. The significant correlation between LDF and skin temperature signals across phases and limbs (PORH rs :0.633 ($p < 0.001$); ICE rs: 0.820 ($p < 0.001$)) confirms the close relationship between skin circulation and skin temperature.

We also determined that 3 minutes is the proper time to achieve a significant difference from baseline LDF and temperature measurements. The reproducibility of skin microvascular reactivity during fast cooling was tested before with a custom-designed cooling LDF probe applied for 5 and 30 minutes (27). The authors obtained good reproducibility at 5 minutes, with reduced variability at 15°C, compared to 24°C. However, the long-term reproducibility (repeated

exemplos ilustrativos, esta resposta foi detectada nos membros inferiores e superiores com a massagem de curta duração e de intensidade ligeira (21) e com o reflexo venoarteriolar (22,23). Estas observações levaram-nos a concluir que não estávamos a observar uma resposta local, mas sim uma resposta complexa mediada centralmente com múltiplos sensores e efectores que necessitam de ser melhor esclarecidos (24).

A nossa abordagem indica que o AEG resulta num fenómeno semelhante, em que uma vasoconstrição inicial, induzida localmente pela exposição ao gelo, é sustentada por um fluxo vasoconstritor (autonómico) também observado na mão contralateral, que persiste até ao fim do desafio. Nesta fase, ocorre um período de perfusão, tal como observado noutros desafios, incluindo a HRPO. Tem sido aceite que a hiperemia reactiva indica a resposta de perfusão a um breve período de isquemia induzida por oclusão arterial (25,26). No entanto, os nossos dados contradizem este ponto de vista, uma vez que (a) a isquémia não pode estar presente quando não é atingida uma perfusão 0 e (b) como demonstrado, a vasoconstrição e a perfusão relacionadas com o gelo também não podem ser relacionada com a isquemia. Ambas as fases (fases II e III) de ambos os procedimentos parecem conduzir a resultados semelhantes. No entanto, os mecanismos envolvidos na hipoperfusão e nas fases de perfusão e recuperação com a HRPO e o AEG têm tempos distintos, sugerindo que são diferentes, uma vez que não foram encontradas correlações significativas de perfusão entre os dois procedimentos.

Foi relatado que o AEG envolve menos desconforto e é mais bem tolerado do que a HRPO (26), e relatado que o arrefecimento local pode apresentar melhor reprodutibilidade do que a HRPO (9). A variabilidade nas medições de LDF foi reduzida no protocolo AEG em comparação com a HRPO o que pode resultar de menos artefactos de movimento (sinal), incluindo a ausência de manipulação da braçadeira como movimento do participante. A correlação significativa entre os sinais de LDF e de temperatura da pele em todas as fases e membros (HRPO rs :0,633 ($p < 0,001$); AGE rs: 0,820 ($p < 0,001$)) confirma a estreita relação entre a circulação e a temperatura da pele.

Também observámos que bastam 3 minutos para obter uma diferença significativa em relação às medições de LDF e de temperatura em repouso. A reprodutibilidade da reatividade microvascular da pele durante o arrefecimento rápido foi testada anteriormente com uma sonda LDF de arrefecimento personalizada aplicada durante 5 e 30 minutos (27).

protocol after 1 week) was better with the 30-minute protocol. This could be due to early vasodilation associated with the fast cooling (the rate of cooling in this study was $-16^{\circ}\text{C}/\text{min}$), described by Yamazaki et. al, as being dependent on the rate and extent of cooling (28). Although we could not control the cooling rate in our study, the minimal temperature achieved during the cooling challenge was 17°C , from a baseline temperature of 24°C (decrease of $-7^{\circ}\text{C}/10$ minutes). Furthermore, this phenomenon is described to be more frequent with full immersion in cold water.

The ice cooling challenge shows an important potential to be applied in the study of mechanisms underlying vascular disease, namely in the Raynaud's phenomenon (RP) (1). To assess functional vascular function in RP, infrared thermography is often used. This non-invasive technique measures surface temperature as a surrogate of blood flow. Usually, the temperature challenge is incorporated in the evaluation protocol, commonly with full immersion of proper gloved hands in cold water (15°C - 20°C) for 1 minute (29). An advantage of our ICE procedure is that temperature and blood perfusion can be measured simultaneously during the dynamic test in both hands, limiting analysis bias and being less time-consuming, especially given the good correlation between blood flux and temperature obtained in our study, contrary to the results of others (30).

The limitations of the study include the small number of participants and the lack of control of general hemodynamics during the protocols, despite the fact that the study population consisted only of healthy young people. However, this is one of the few studies that explores the application of ice as a challenge to study cardiovascular adaptive mechanisms. The results, although exploratory, are compelling enough to justify continuing research in this direction.

Os autores obtiveram uma boa reprodutibilidade aos 5 minutos, com uma variabilidade reduzida a 15°C , em comparação com 24°C . No entanto, a reprodutibilidade a longo prazo (protocolo repetido após 1 semana) foi melhor com o protocolo de 30 minutos. Admite-se que tal possa dever-se à vasodilatação precoce associada ao resfriamento rápido (a taxa de resfriamento neste estudo foi de $-16^{\circ}\text{C}/\text{min}$), descrita por Yamazaki et. al, como sendo dependente da taxa e extensão do arrefecimento (28). Embora não tenhamos podido controlar a taxa de arrefecimento no nosso estudo, a temperatura mínima atingida durante o desafio de arrefecimento foi de 17°C , a partir de uma temperatura de base de 24°C (diminuição de $-7^{\circ}\text{C}/10$ minutos). Além disso, este fenómeno é descrito como sendo mais frequente com a imersão total em água fria.

O arrefecimento pelo gelo apresenta um importante potencial de aplicação no estudo dos mecanismos subjacentes à doença vascular, nomeadamente no fenómeno de Raynaud (FR) (1). Para avaliar a função vascular funcional no FR, é frequentemente utilizada a termografia de infravermelhos. Esta técnica não-invasiva mede a temperatura da superfície como um substituto do fluxo sanguíneo. Normalmente, o desafio da temperatura é incorporado no protocolo de avaliação, geralmente com a imersão total das mãos com luvas adequadas em água fria (15°C - 20°C) durante 1 minuto (29). Uma vantagem do nosso procedimento de AEG é que a temperatura e a perfusão sanguínea podem ser medidas ao mesmo tempo durante o teste dinâmico em ambas as mãos, limitando o viés de análise com a vantagem de ser menos demorado, especialmente dada a boa correlação entre o fluxo sanguíneo e a temperatura obtida neste estudo, ao contrário de outros (30).

Como limitações do estudo devemos apontar o pequeno número de participantes, e a falta de controle da hemodinâmica geral durante o desenrolar dos protocolos, apesar de se a população estudada envolver apenas jovens saudáveis. No entanto, este é um dos poucos estudos que explora a aplicação do gelo como um desafio para estudar os mecanismos adaptativos cardiovasculares. Os resultados, ainda que exploratórios, são apelativos para justificar a continuação desta direção de investigação.

Conclusion

ICE proved to be an effective method to elicit quantifiable vascular adaptive changes, potentially advantageous to be applied in vascular research as an alternative to the cuff-induced POHR. ICE also seems to be interesting to explore Raynaud's phenomenon, in consideration of the full cold water immersion used as the current standard.

Authors Contributions Statement

LMR, JDA and JC, conceptualization and study design; PVP and JC, experimental implementation, management and data analysis; LMR and JC, drafting and editing; LMR, JDA, PVP, supervision reviewing and final writing. All authors approved the final submitted version.

Funding

This study was supported by FCT—Foundation for Science and Technology, I.P. (Portugal), under the (UIDB/04567/2020) and (UIDP/04567/2020) programs. Imaging instrumentation provided by ALIES-COFAC.

Ethical Declaration

All procedures and experimental protocol were previously submitted to the institutional Ethical Commission (Ethical Commission of Universidade Lusófona Health Sciences Department)

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to Marisa Nicolai and to all participants.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no financial and/or personal relationships that could constitute a potential conflict of interest. The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review process.

Conclusão

O AEG demonstrou ser um método eficaz para provocar alterações adaptativas vasculares, potencialmente vantajoso para ser aplicado na investigação vascular como alternativa à HRPO induzida pela manga de pressão. O AEG também parece ser interessante para explorar o fenómeno de Raynaud, se considerarmos a imersão total em água fria utilizada como padrão.

Declaração de Contribuição dos Autores

LMR, JDA e JC, concetualização e desenho do estudo; PVP e JC, implementação experimental, gestão e análise de dados; LMR e JC, redação e edição; LMR, JDA, PVP, supervisão, revisão e redação final. Todos os autores aprovaram a versão final submetida.

Financiamento

Este estudo foi apoiado pela FCT-Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P. (Portugal), ao abrigo dos programas (UIDB/04567/2020) e (UIDP/04567/2020). Instrumento de imagem fornecido pelo ALIES-COFAC.

Declaração ética

Todos os procedimentos e protocolo experimental foram previamente submetidos à Comissão de Ética institucional (Comissão de Ética do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Lusófona)

Agradecimentos

TOs autores gostariam de expressar os seus agradecimentos a Marisa Nicolai e a todos os participantes.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não ter relações financeiras e/ou pessoais que possam constituir um potencial conflito de interesses. Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão.

References / Referências

- Hellmann, M., Roustit, M., & Cracowski, J. L. (2015). Skin microvascular endothelial function as a biomarker in cardiovascular diseases? *Pharmacological Reports*, 67, 803-810. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.05.008>
- Low, D. A., Jones, H., Cable, N. T., Alexander, L. M., & Kenney, W. L. (2020). Historical reviews of the assessment of human cardiovascular function: interrogation and understanding of the control of skin blood flow. *European Journal of Applied Physiology*, 120, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s00421-019-04246-y>
- Holowatz, L. A., Thompson-Torgerson, C. S., & Kenney, W. L. (2008). The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *Journal of applied physiology*, 105(1), 370-372. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00858.2007>
- Bottino, D. A., & Bouskela, E. (2023). Non-invasive techniques to access in vivo the skin microcirculation in patients. *Frontiers in Medicine*, 9, 1099107. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1099107>
- Rizzoni, D., Mengozzi, A., Masi, S., Agabiti Rosei, C., De Ciuceis, C., & Virdis, A. (2022). New noninvasive methods to evaluate microvascular structure and function. *Hypertension*, 79(5), 874-886. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17954>
- Darvin, M. E. (2023). Optical methods for non-invasive determination of skin penetration: current trends, advances, possibilities, prospects, and translation into in vivo human studies. *Pharmaceutics*, 15(9), 2272. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092272>
- Roustit, M., & Cracowski, J. L. (2013). Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends in pharmacological sciences*, 34(7), 373-384. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.05.007>
- Huang, A. L., Silver, A. E., Shvenke, E., Schopfer, D. W., Jahangir, E., Titas, M. A., Shpilman, A., Menzoian, J. O., Watkins, M. T., Raffetto, J. D., Gibbons, G., Woodson, J., Shaw, P. M., Dhady, M., Eberhardt, R. T., Keaney, J. F., Jr, Gokce, N., & Vita, J. A. (2007). Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(10), 2113-2119. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.147322>
- Shirazi, B. R., Valentine, R. J., & Lang, J. A. (2021). Reproducibility and normalization of reactive hyperemia using laser speckle contrast imaging. *PLoS one*, 16(1), e0244795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244795>
- Henni, S., Hersant, J., Loufrani, L., Duval, G., Humeau-Heurtier, A., SIMS Group, Riou, J., Abraham, P., & SOCOS Group (2019). Painless local pressure application to test microvascular reactivity to ischemia. *Microvascular research*, 122, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.10.013>
- Becerro de Bengoa Vallejo, R., Losa Iglesias, M. E., López, D. L., Posada-Moreno, P., López, P. P., Rodríguez, M. F., & Crespo, A. S. (2013). Effects of digital tourniquet ischemia: a single center study. *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery (et al.)*, 39(4), 584-592. <https://doi.org/10.1111/dsu.12115>
- Charkoudian N. (2003). Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clinic proceedings*, 78(5), 603-612. <https://doi.org/10.4065/78.5.603>
- World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191-2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
- Obeid, A. N., Barnett, N. J., Dougherty, G., & Ward, G. (1990). A critical review of laser Doppler flowmetry. *Journal of medical engineering & technology*, 14(5), 178-181. <https://doi.org/10.3109/03091909009009955>
- Cracowski, J. L., & Roustit, M. (2016). Current Methods to Assess Human Cutaneous Blood Flow: An Updated Focus on Laser-Based Techniques. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 23(5), 337-344. <https://doi.org/10.1111/micc.12257>
- Luck, J. C., Kunselman, A. R., Herr, M. D., Blaha, C. A., Sinoway, L. I., & Cui, J. (2022). Multiple Laser Doppler Flowmetry Probes Increase the Reproducibility of Skin Blood Flow Measurements. *Frontiers in physiology*, 13, 876633. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.876633>
- Balasubramanian, G., Chockalingam, N., & Naemi, R. (2021). A systematic evaluation of cutaneous microcirculation in the foot using post-occlusive reactive hyperemia. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 28(5), e12692. <https://doi.org/10.1111/micc.12692>
- Shirazi, B. R., Valentine, R. J., & Lang, J. A. (2021). Reproducibility and normalization of reactive hyperemia using laser speckle contrast imaging. *PLoS one*, 16(1), e0244795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244795>
- Paine, N. J., Hinderliter, A. L., Blumenthal, J. A., Adams, K. F., Jr, Sueta, C. A., Chang, P. P., O'Connor, C. M., & Sherwood, A. (2016). Reactive hyperemia is associated with adverse clinical outcomes in heart failure. *American heart journal*, 178, 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2016.05.008>
- Philpott, A., & Anderson, T. J. (2007). Reactive hyperemia and cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(10), 2065-2067. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.149740>
- 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/japplphysiol.00437.2019>
- Silva, H., Ferreira, H. A., da Silva, H. P., & Monteiro Rodrigues, L. (2018). The Venoarteriolar Reflex Significantly Reduces Contralateral Perfusion as Part of the Lower Limb Circulatory Homeostasis in vivo. *Frontiers in physiology*, 9, 1123. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01123>
- Florindo, M., Nuno, S., Andrade, S., Rocha, C., and Rodrigues, L. M. (2021). The acute modification of the upper-limb perfusion in vivo evokes a Prompt adaptive hemodynamic response to reestablish cardiovascular homeostasis. Physiology21 Annual Conference Abstract Book 2021. Available online: <https://www.physoc.org/abstracts/acute-modification-of-upper-limb-perfusion-in-vivo-evokes-a-prompt-adaptive-hemodynamic-response-to-re-establish-cardiovascular-homeostasis/>
- Monteiro Rodrigues, L., Rocha, C., Andrade, S., Granja, T., & Gregório, J. (2023). The acute adaptation of skin microcirculatory perfusion in vivo does not involve a local response but rather a centrally mediated adaptive reflex. *Frontiers in physiology*, 14, 1177583. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1177583>
- Henni, S., Hersant, J., Loufrani, L., Duval, G., Humeau-Heurtier, A., SIMS Group, Riou, J., Abraham, P., & SOCOS Group (2019). Painless local pressure application to test microvascular reactivity to ischemia. *Microvascular research*, 122, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.10.013>
- Rosenberry, R., & Nelson, M. D. (2020). Reactive hyperemia: a review of methods, mechanisms, and considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 318(3), R605-R618. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00339.2019>

27. Roustit, M., Maggi, F., Isnard, S., Hellmann, M., Bakken, B., & Cracowski, J. L. (2010). Reproducibility of a local cooling test to assess microvascular function in human skin. *Microvascular research*, 79(1), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2009.11.004>
28. Yamazaki, F., Sone, R., Zhao, K., Alvarez, G. E., Kosiba, W. A., & Johnson, J. M. (2006). Rate dependency and role of nitric oxide in the vascular response to direct cooling in human skin. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 100(1), 42–50. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00139.2005>
29. Herrick, A. L., & Murray, A. (2018). The role of capillaroscopy and thermography in the assessment and management of Raynaud's phenomenon. *Autoimmunity reviews*, 17(5), 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.036>
30. Clark, S., Dunn, G., Moore, T., Jayson, M., 4th, King, T. A., & Herrick, A. L. (2003). Comparison of thermography and laser Doppler imaging in the assessment of Raynaud's phenomenon. *Microvascular research*, 66(1), 73–76. [https://doi.org/10.1016/s0026-2862\(03\)00018-9](https://doi.org/10.1016/s0026-2862(03)00018-9)