

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação da resposta autonômica simpática à exposição da face ao frio de indivíduos normais e de pacientes com Diabetes Mellitus com e sem microangiopatia**

Laura Brugnara

Orientadora: Profa. Dra. Helena Schmid

Dissertação de Mestrado

2004

## Agradecimentos

Agradeço, inicialmente, à minha orientadora, Profa. Dra. Helena Schmid, que fez parte importante da minha formação clínica e científica desde o período da graduação em Medicina. Tive com ela os primeiros contatos com a pesquisa e participação em diversos projetos como bolsista de iniciação científica. Compartilho com ela agora a conclusão de uma longa etapa de trabalhos, na qual muito aprendi.

Aos colegas e amigos Dra. Cristina Neumann e Dr. Cláudio Chiyoshi, pelo apoio e participação fundamentais na realização deste trabalho.

Aos alunos de graduação, pelo auxílio no atendimento aos pacientes do ambulatório de Diabetes Mellitus, e na coleta e tabulação de dados, em especial aos Dr. Fernando Waldemar, Dr. Guilherme Klein, Dr. Maurício Miura e Dra. Christiane Traiber.

Aos Cursos de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Endocrinologia e Cardiologia, que me proporcionaram, com excelentes professores, a oportunidade de exercitar e aprimorar o conhecimento científico.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio científico, especialmente o apoio da bioestatística Sra. Vânia Hirakata.

Aos indivíduos controles e pacientes, que colaboraram para a realização deste estudo.

À FAPERGS e ao CNPq, que forneceram recursos financeiros para o estudo.

Dedico esta dissertação às minhas pessoas mais queridas: Paulo, Mariana, André, Celito e Anna, pelo amor, apoio e compreensão.

## ÍNDICE

Introdução.....	4
Revisão da Literatura.....	7
I.    Diabetes Mellitus e desnervação .....	7
II.   Diabetes Mellitus e hiperatividade simpática.....	11
III.  Teste do frio na face.....	17
Objetivos.....	25
Referências da Revisão da Literatura.....	26
Artigo 1 – versão em inglês: Heart rate and blood pressure responses of healthy subjects to the cold face test.....	32
– versão em português: Resposta da frequência cardíaca e da pressão arterial de indivíduos normais ao frio na face.....	50
Artigo 2 – versão em inglês: Blunted decline in the sympathetic response to the cold face test in patients with Diabetes Mellitus without autonomic dysfunction.....	68
– versão em português: Retardo no descenso da resposta autonômica simpática à exposição da face ao frio no Diabetes Mellitus sem disfunção autonômica.....	91

## INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus corresponde a uma alteração metabólica que tem como característica principal a deficiência parcial ou completa de insulina. O grupo de pacientes com deficiência grave na secreção de insulina, mais freqüentemente com o início do distúrbio quando em faixa etária jovem, com componente auto-imune e correspondendo a menos de 9% dos diabéticos, é classificado como portador de Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1). O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum, responsável por aproximadamente 90% dos diabéticos, compondo um grupo de pacientes habitualmente com mais de 40 anos, que apresenta deficiência parcial da ação da insulina e posterior deficiência das células beta. Outros tipos de Diabetes não atingem, em conjunto, 1% da população total de diabéticos, que é o caso dos induzidos por drogas, dos genéticos (sindrômicos), entre outros. O Diabetes Mellitus gestacional entra em uma classificação a parte (American Diabetes Association, 2004).

Estima-se que 7,6 % da população brasileira, entre 30 e 69 anos, e 8,9% da população porto-alegrense sejam de portadores de Diabetes Mellitus (Ministério da Saúde, Funasa). Estima-se também que metade dos portadores de DM2 não se sabem diabéticos, por se tratar de uma doença com poucos sintomas específicos quando em fases mais iniciais. Estes pacientes, porém, já estão sofrendo as conseqüências da patologia e sem o acompanhamento adequado. A situação faz com que nos questionemos não apenas quanto a necessidade do diagnóstico precoce, mas também sobre quais aspectos do Diabetes e suas complicações poderíamos estar identificando de forma mais precoce.

O controle do Diabetes passa pelo controle das complicações agudas, que são caracterizadas por hipoglicemias ou hiperglicemias, e das complicações crônicas. No grupo de complicações crônicas temos a neuropatia, a retinopatia, a nefropatia e a

cardiopatia. Como base fisiopatológica para estas complicações crônicas, encontramos, em especial, a microangiopatia, a disfunção endotelial e a macrovasculopatia.

O nosso grupo de pesquisa vem, há vários anos, se dedicando ao estudo das respostas do sistema autônomo no Diabetes. As arritmias cardíacas associadas a neuropatia autonômica do Diabetes determinam taxas importantes de mortalidade nestes pacientes. O presente estudo foi motivado pela busca de um teste capaz de estimular o sistema nervoso simpático cardíaco, e conseqüentemente, o endotélio das coronárias de pacientes com Diabetes. Por outro lado, a elevada morbi-mortalidade associada a neuropatia diabética com arritmia cardíaca nos faz buscar o seu melhor entendimento, avaliação e acompanhamento.

A exposição ao frio é uma forma utilizada para avaliar respostas do organismo a estímulos simpáticos. Em pacientes com Diabetes, entendemos que, para ocorrer um estímulo simpático, o frio deve ser aplicado na face, uma vez que esta área costuma ser a última a apresentar desnervação (Low PA e Fealey RD, 1999).

Estímulos menos fisiológicos, mas similares aos obtidos quando se estimula a face com frio, são obtidos, por exemplo, quando se infunde acetilcolina diretamente nas artérias coronárias (Horio Y, Yasue H, Rokutanda M, Nakamura N, Ogawa H, Takaoka K, Matsuyama K e Kimura T, 1986; Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E e Attali J-R, 1993). Em resposta a este teste, observa-se que pacientes com Diabetes Mellitus freqüentemente apresentam, ao invés de vasodilatação (resposta normal), uma vasoconstrição (Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E e Attali J-R, 1993), a qual precede a formação de placas de ateroma.

O estímulo do frio em face de pessoas com Diabetes pode, portanto, ser útil para, de forma não invasiva, avaliar as respostas a um estímulo simpático. Para que este estímulo ocorra, no entanto, é necessária alguma integridade da inervação simpática proveniente da área da face até a área cardíaca, quando as respostas da freqüência

cardíaca e pressão arterial é que são avaliadas. Embora a resposta normal da frequência cardíaca e pressão arterial ao estímulo com frio na face já tenha sido em parte descrita em alguns estudos (Heistad DD, Abboud FM e Eckstein JW, 1968; Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R e Nelson E, 1979; Finley JP, Bonet JF e Waxman MB, 1979; Heath ME e Downey JA, 1990; Allen MT, Shelley KS e Boquet AJ, 1992), pouco se sabe sobre as respostas de pessoas com Diabetes com e sem complicações crônicas a este estímulo.

## REVISÃO DA LITERATURA

### I. DIABETES MELLITUS E DESNERVAÇÃO:

A desnervação progressiva que acompanha o Diabetes é conhecida como neuropatia do Diabetes. Compromete tanto a inervação somática como autonômica, sendo considerada a complicação mais comum e de maior morbi-mortalidade. É também a forma mais comum de neuropatia nos países desenvolvidos e é responsável por mais admissões hospitalares do que as outras complicações do Diabetes somadas (Vinik AI, Park TS, Stansberry KB e Pittenger GL, 2000). Mais especificamente, é definida como uma alteração demonstrável clinicamente ou por métodos diagnósticos, que ocorre em pacientes portadores de Diabetes sem outras causas de neuropatia (San Antonio Conference on Diabetic Neuropathy, 1988).

A neuropatia diabética é uma alteração heterogênea, com uma grande variedade de apresentações clínicas. Ela pode afetar nervos motores e sensitivos, proximais e periféricos, além do sistema nervoso autônomo, em intensidades e locais diferentes. Pelo motivo da apresentação ser tão heterogênea e pela diversidade de critérios e métodos utilizados para definir a neuropatia, é difícil estimar precisamente a prevalência em pacientes diabéticos. Os estudos apresentam dados que variam de 10 a 90% este índice (Vinik AI, Park TS, Stansberry KB e Pittenger GL, 2000; Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD e Freeman R, 2003).

As complicações neurológicas ocorrem igualmente nos tipos 1 e 2, assim como nas diversas formas de Diabetes Mellitus adquiridas (Greene DA, Sima AAF, Stevens MJ, Feldman EL e Lattimer SA, 1992; Vinik AI, Park TS, Stansberry KB e Pittenger GL, 2000). A neuropatia periférica tem como principais consequências ulcerações e amputações, o que reduz em muito a produtividade, qualidade de vida e sobrevivência do indivíduo. O

comprometimento autonômico, além de alterações funcionais em diversos órgãos, quando grave, determina uma taxa de 56% de mortalidade em um período de 5 anos em pacientes com neuropatia autonômica clínica, segundo Ewing (Ewing JD, Campbell IW e Clarke BF, 1980) e 25 a 50% em 5 a 10 anos, segundo revisão de Vinik (Vinik AI, Park TS, Stansberry KB e Pittenger GL, 2000).

A neuropatia diabética é pobremente distinta de outras síndromes sensoriomotoras como as hereditárias, imunes (síndrome de Sjögren), tóxicas (álcool, medicamentos), metabólicas (uremia, hepática e outros) e a desnutrição. Estas causas de neuropatia devem ser excluídas para que a neuropatia seja considerada secundária ao Diabetes (Dyck JB e Dyck PJ, 1999).

De acordo com a Convenção de San Antonio, os principais grupos de distúrbios neurológicos característicos do Diabetes são: 1) neuropatia subclínica, determinada por anormalidades em testes eletrodiagnósticos e testagem sensorial quantitativa, 2) neuropatia clínica difusa, com síndromes sensório-motoras distais simétricas e autonômicas e 3) síndromes focais. A neuropatia subclínica é diagnosticada com base em: a) testes eletrodiagnósticos anormais com diminuição da velocidade de condução ou diminuição das amplitudes, b) testes quantitativos anormais sensoriais de vibração, tátil e térmico para calor e frio e c) testes funcionais autonômicos quantitativos que demonstram diminuição da variação da frequência cardíaca com respiração profunda, manobra de Valsalva e teste postural (Vinik AI, Park TS, Stansberry KB e Pittenger GL, 2000).

### Evolução das Neuropatias

As disfunções mais precoces são mais comumente a alteração de condução nervosa e a redução da resposta da frequência cardíaca a respiração profunda ou a manobra de Valsalva. Os primeiros sinais que se desenvolvem após ou concomitantes



com as anormalidades acima são a diminuição ou a perda de reflexo aquileu e diminuição ou perda da sensibilidade vibratória no primeiro pododáctilo. Com um envolvimento mais grave, os pacientes desenvolvem vários graus e tipos de perdas sensoriais nos dedos, pés e pernas, anormalidades de reflexos musculares, anormalidades autonômicas e fraqueza dos pequenos músculos dos pés e dos músculos dorsoflexores do tornozelo (Dyck JB e Dyck PJ, 1999). A neuropatia periférica sensório-motora inicia-se tipicamente nas extremidades e estende-se proximalmente nos membros inferiores e superiores, sendo a face o último local de desnervação (Low PA e Fealey RD, 1999).

No DM1, a polineuropatia periférica comumente se desenvolve em pacientes os quais tenham tido hiperglicemia grave cronicamente e após alguns anos de doença. No DM2, o mais característico é que a neuropatia também se desenvolva após anos de hiperglicemia crônica, porém pode estar presente já no diagnóstico de Diabetes, apontando para um período de hiperglicemia não diagnosticado (Dyck JB e Dyck PJ, 1999).

#### Avaliação da neuropatia autonômica

Anormalidades da função autonômica são classicamente avaliadas através do uso de testes cardiovasculares de Ewing (Ewing DJ e Clarke BF, 1982) e, em nosso meio, padronizados por Neumann (Neumann C e Schmid H, 1997). A frequência cardíaca, monitorizada por eletrocardiograma, é avaliada após 15 minutos de repouso (3 medidas) e antes e após a respiração profunda, manobra de Valsalva, e posição supina. A resposta da pressão arterial à variação da posição também é utilizada. Os testes são realizados conforme descrição anterior (Ewing DJ e Clarke BF, 1982; Neumann C e Schmid H, 1997).

## Neuropatia autonômica X outras complicações

A neuropatia autonômica vem sendo associada a outras complicações do Diabetes. Discute-se se a desnervação desencadeia ou acelera as outras complicações ou se ocorre simultaneamente, por apresentar uma mesma base fisiopatológica. Vários estudos têm se preocupado com esta questão.

Massin e colaboradores (Massin MM, Derkenne B, Tallsund M, Rocour-Brumioul D, Ernould C, Lebrethon MC e Bourguignon JP, 1999), em um estudo com crianças e adolescentes diabéticos do tipo 1 sem nenhuma clínica de complicações ou neuropatia, nefropatia ou retinopatia, demonstraram correlação entre diminuição da variabilidade da frequência cardíaca em exame com holter de 24 horas e grau de microalbuminúria. Os autores concluem que o mesmo processo patológico microvascular deve produzir neuropatia e nefropatia. A disfunção autonômica, por redução do descenso noturno da pressão arterial, deve também facilitar o desenvolvimento de nefropatia pelo aumento da pressão intra-glomerular (Massin MM, Derkenne B, Tallsund M, Rocour-Brumioul D, Ernould C, Lebrethon MC e Bourguignon JP, 1999).

Schmid e colaboradores (Schmid H, Schaan B, Ceconello F, Maestri T e Neumann C, 1995) analisaram a associação entre neuropatia autonômica e outras duas complicações do Diabetes, a nefropatia e a retinopatia. Foram estudados 35 pacientes portadores de DM2, 17 deles sem neuropatia autonômica, avaliada através de testes cardiovasculares normais, e 18 com neuropatia autonômica, definida através de dois ou mais testes alterados. A presença de retinopatia proliferativa correlacionou-se significativamente com a presença de disfunção autonômica cardiovascular. Os autores sugerem que pacientes com neuropatia autonômica poderiam ter um maior grau de obstrução dos vasos retinianos os quais poderiam produzir maior isquemia retiniana e

desencadear um estímulo para a proliferação de novos vasos. Outra possibilidade é de que a microangiopatia severa, se apresentando como retinopatia proliferativa, pode ser um indicador de risco de um processo etiológico que promove isquemia dos *vasa nervorum* e pode contribuir para o desenvolvimento de neuropatia autonômica. A isquemia de vasos periféricos tem sido sugerida como um possível mecanismo para explicar o desenvolvimento de neuropatia periférica.

Clarke e colaboradores (Clarke CF, Eason M, Reilly A, Boyce C e Werther GA, 1999) estudaram 30 adolescentes DM1 portadores de microalbuminúria (excreção urinária de albumina entre 20 e 200  $\mu\text{g}/\text{min}$ ) e 30 diabéticos sem microalbuminúria. Identificaram que os microalbuminúricos apresentavam testes autonômicos cardiovasculares e de adaptação pupilar ao escuro significativamente diferentes dos apresentados pelos normoalbuminúricos. Os microalbuminúricos apresentaram também pressões arteriais sistólica e diastólica maiores, assim como pior controle glicêmico. Os autores concluíram que existe uma associação entre neuropatia autonômica e microalbuminúria, porém não puderam determinar se foi uma associação causal ou se ambas as anormalidades resultaram diretamente de hiperglicemia prolongada.

Sundkvist G e Lilja B (1993), em um estudo prospectivo, analisaram 35 pacientes com DM1 ao longo de 11 anos para presença de neuropatia autonômica e taxa de filtração glomerular renal (TFG). Inicialmente, os pacientes apresentavam mesmas TFGs, porém alguns com neuropatia autonômica e outros não. Após os 11 anos, houve diminuição da TFG no grupo neuropata, o que não ocorreu no outro grupo. A avaliação da microalbuminúria ainda não era utilizada quando o estudo foi inicialmente desenhado, mas foi analisada no seu final. Vinte e quatro pacientes tiveram a albuminúria verificada (16 apresentavam neuropatia autonômica): 5 dos 16 com e 0 dos 8 sem neuropatia apresentaram macroalbuminúria ( $> 300 \text{ mg}/24 \text{ h}$ ); 6 dos 16 com e 3 dos 8 sem apresentaram microalbuminúria ( $30 - 300 \text{ mg}/24 \text{ h}$ ); e 5 dos 16 com e 5 dos 8 sem

neuropatia eram normoalbuminúricos (< 30 mg/24 h). Os autores concluem que a neuropatia autonômica prediz uma deterioração na TFG.

Krolewski e colaboradores (Krolewski AS, Barzilay J, Warram JH, Martin BC, Pfeifer M e Rand LI, 1992) estudaram um grupo de 74 pacientes diabéticos com retinopatia proliferativa (RPP) comparando com um grupo de 88 com retinopatia não proliferativa ou sem retinopatia. Os grupos diferiam entre si quanto ao controle glicêmico, grau de hipertensão arterial, presença de nefropatia e presença de neuropatia autonômica cardiovascular. Comparativamente aos pacientes sem neuropatia autonômica, aqueles com 1 teste cardiovascular alterado em 3, apresentaram um risco 35 vezes maior de RPP, enquanto pacientes com 2 ou 3 testes alterados tinham 77 vezes mais chances de apresentar RPP. Foi realizado controle estatístico para nefropatia e controle glicêmico. Independente da alteração da função renal, a presença de RPP esteve fortemente associada à presença de neuropatia autonômica. Uma possível explicação é que a presença de neuropatia contribua para o desenvolvimento de neovascularização retiniana. Pacientes com neuropatia autonômica podem ter anormalidades na regulação do fluxo sanguíneo retiniano, o qual pode levar a não perfusão da retina, hipóxia e neovascularização. Outra interpretação do resultado seria que a neuropatia faria o papel de um marcador de risco, isso é, um marco de um processo comum às duas complicações.

## II. DIABETES MELLITUS E HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA

Pacientes com neuropatia autonômica têm um risco aumentado, e bem estabelecido, de morte súbita (O'Brien IA, McFadden JP e Corral RJM, 1991; Navarro X, Kennedy WR, Loewenson RB e Sutherland DER, 1990). A neuropatia autonômica do Diabetes (NAD) facilita arritmias malignas provavelmente por alterar a estabilidade elétrica e/ou comprometer o fluxo sanguíneo miocárdico (Kahn JK, Sisson JC e Vinik AI, 1987). Uma das causas das arritmias ventriculares malignas talvez seja uma redução do tônus parassimpático protetor e isquemia miocárdica (Schwartz PJ, Vanoli E, Stramba-Badiale M, De Ferrari GM, Billman GE e Foreman RD, 1988; Lown B e Verrier RL, 1976). Estudos utilizando tomografia positrônica por emissão (PET) e C-11 hidroxiefedrina ([<sup>11</sup>C]HED, um análogo da norepinefrina) como marcador mostram, nos pacientes com NAD avançada, áreas de desnervação e ilhas de inervação simpática persistente no ventrículo esquerdo proximal, associadas com déficit no fluxo coronariano de reserva (Allmann KC, Stevens MJ, Wieland DM, Hutchins GD, Wolfe ER, Greene DA e Schwaiger M, 1993).

Em várias situações, um dos mecanismos propostos para explicar a isquemia na ausência de lesão coronariana definida é o estímulo da inervação cardíaca simpática. Este estímulo produz taquicardia e aumento da contratilidade acompanhada por aumento do consumo miocárdico de oxigênio, aumento do fluxo sanguíneo coronariano, mas diminuição do conteúdo de oxigênio no seio coronariano (Mohrman DE e Feigl EO, 1978). O mecanismo envolvido na vasomotricidade mediada pelo sistema alfa-adrenérgico seria: estímulo de nervos simpáticos, os quais modulam o fluxo sanguíneo miocárdico (MBF) ativando adrenoreceptores nos músculos lisos (Young MA, Knight DR e Vatner SF, 1987) e no endotélio, sendo que o último libera mediadores para a vasodilatação, como óxido

nítrico (Mohrman DE e Feigl EO, 1978) e prostaciclina (Taylor AA, 2001), e vasoconstrição. Os agentes vasoconstritores denominados fatores de contração do endotélio (EDCFs), incluem a endotelina-1 (ET-1), tromboxano A2, prostaglandinas H2 e ânions superóxidos (Taylor AA, 2001). Pressupõe-se que os pacientes que apresentem vasoconstrição durante estímulo simpático, como o provocado pelo frio, apresentem durante esse estímulo um aumento da liberação de endotelina-1 e/ou diminuição da liberação de óxido nítrico e prostaciclina ao nível coronariano e plasmático.

Em estudo experimental com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, Schmid e colaboradores (Schmid H, Forman LA, Cao X, Sherman OS e Stevens MJ, 1999) acompanharam a evolução da desnervação cardíaca destes animais através da captação miocárdica da [11C]HED e compararam com mudanças regionais dos níveis de *Nerve Growth Factor* – NGF (Fator de Crescimento do Nervo) - e conteúdo de norepinefrina após 6 e 9 meses de observação. Em 6 meses, o conteúdo de NGF do ventrículo esquerdo dos ratos diabéticos caiu 52% no segmento proximal do miocárdio, em relação a ratos controles, e 82% distalmente. No 9<sup>o</sup> mês, a retenção de [11C]HED declinou nos segmentos proximais e distais dos ratos diabéticos em torno de 42% e o conteúdo de norepinefrina e NGF reduziram paralelamente. Desta forma, ratos com Diabetes de 6 meses de evolução apresentam uma desnervação cardíaca simpática heterogênea, com um máximo de desnervação ocorrendo distalmente. Poderia-se extrapolar o mecanismo de neuropatia autonômica cardíaca para humanos diabéticos neuropatas que apresentam, no coração, ilhas de inervação preservadas e instabilidade miocárdica.

Stevens e colaboradores (Stevens MJ, Raffel DM, Allman KC, Dayanikli F, Ficaró E, Standford T, Wieland DM, Pfeifer MA e Schwaiger M, 1998) estudaram pacientes diabéticos com diferentes graus de neuropatia e controles não diabéticos. Os pacientes diabéticos foram divididos entre livres de neuropatia autonômica ( $\leq 1$  teste cardiovascular

alterado em 5), neuropatia autonômica moderada (2 ou 3 testes alterados) e neuropatia autonômica grave (4 ou 5 testes alterados). Realizaram estudos cardíacos destes pacientes, que eram livres de cardiopatia isquêmica ou congestiva, utilizando PET-scan com [11C]HED. Em sujeitos com NAD moderada, um defeito no traçador foi observado apenas na parede distal inferior do ventrículo esquerdo, enquanto em pacientes com NAD grave o defeito envolveu as paredes distal e lateral antero-lateral e inferior. Houve uma retenção absoluta do traçador 33% maior na região proximal nos pacientes com NAD grave em comparação com os sem NAD. Distalmente, a retenção do traçador foi 33% menor em NAD grave comparados com os sem NAD. Concluem que o Diabetes deve levar a uma desnervação ventricular esquerda simpática com hiperinervação proximal. Esta combinação poderia resultar em instabilidade miocárdica elétrica.

Outras alterações cardiovasculares são também atribuídas à neuropatia autonômica. A ausência de queda na pressão arterial diastólica durante o sono é associada a neuropatia autonômica e graus diferentes de nefropatia. Um aumento no volume extracelular e uma predominância simpática noturna têm sido propostos como mecanismos para tal alteração. Pecis e colaboradores (Pecis M, Azevedo MJ, Moraes RS, Ferlin EL e Gross JL, 2000) estudaram 39 pacientes com DM1 e verificaram a variação da pressão arterial ao longo de 24 horas para avaliação do descenso noturno, correlacionando o mesmo com outras características desses pacientes. Tais pacientes foram submetidos a avaliações de excreção urinária de albumina (microalbuminúria), taxa de filtração glomerular, avaliação de volume extracelular, pressão arterial e frequência cardíaca de 24 horas ambulatorial, avaliação da variabilidade da frequência cardíaca (para índice simpaticovagal) e prova de *tilt* (induz a diminuição na atividade parassimpática e aumenta a atividade simpática). Os pacientes foram classificados como “mergulhadores” (*dippers* – razão PA diastólica noturna/diurna  $\leq$  0,9) ou “não mergulhadores” (*nondippers* - razão PA diastólica noturna/diurna  $>$  0,9). Foi verificada

predominância da atividade simpática e aumento de albuminúria em pacientes que não apresentaram descenso noturno (“não mergulhadores”).

Avaliando o descenso noturno da pressão arterial em DM1 normotensos, Vörös e colaboradores (Vörös P, Lengyel Z, Nagy V, Németh C, Rosivall L e Kammerer L, 1998) compararam um grupo normoalbuminúrico com outro de microalbuminúricos. O grupo de microalbuminúricos teve médias de pressões arteriais de 24 horas e de período noturno mais elevadas. O grupo de normoalbuminúricos apresentou 1 “não mergulhador” em 39 (2,6%) e o grupo de microalbuminúricos apresentou 7 em 29 (24,1%). A microalbuminúria parece ser um sinal precoce de dano de origem vascular em órgãos. O mecanismo fisiopatológico da albuminúria não é totalmente compreendido, porém, entre outros fatores, a elevação da pressão arterial sistólica e o aumento da carga da pressão arterial no sistema vascular parece ter um papel importante.

Lindmark (Lindmark S, Wiklund U, Bjerle P e Eriksson JW, 2003) sugere que já exista uma atenuação da atividade parassimpática em parentes de 1º grau não diabéticos de pacientes com Diabetes tipo 2, apontando para associação entre hiperatividade simpática e resistência a insulina.



### III. TESTE DO FRIO NA FACE

O teste de aplicação de frio na face vem sendo descrito há várias décadas. Foi inicialmente usado para o estudo fisiológico de nadadores e mergulhadores quando imersos em água fria (*diving reflex* – reflexo do mergulho). Posteriormente estudos apontaram que a imersão apenas da face, sem molhar o corpo inteiro, provocava o mesmo efeito fisiológico (Kawakami Y, Natelson BH e DuBois AB, 1967). Khurana e colaboradores (Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R e Nelson E, 1980) identificaram que a aplicação de frio na face, sem mergulhá-la, e com isso sem a interferência da apnéia na avaliação ou o desconforto do mergulho, tinha efeito semelhante. Hoje vem sendo utilizado com o objetivo de propiciar uma resposta neurológica autonômica do indivíduo, com conseqüente resposta do endotélio, neste caso, em especial, o estímulo simpático.

A via neuroanatômica do reflexo de mergulho consiste em receptores faciais, vias aferentes do nervo trigêmeo, vias eferentes simpáticas e parassimpáticas, e órgãos efetores. Em humanos, as terminações nervosas aferentes têm sido consideradas as sensíveis ao frio, umidade ou dor durante a resposta à imersão da face (Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R e Nelson E, 1980). O estímulo do frio se dá sobre receptores cutâneos que consistem em fibras A- $\delta$  e fibras C (o calor estimula fibras C). Estas fibras entram no tronco cerebral via nervo trigêmeo e descendem ao núcleo *tracto spinalis nervi trigemini* e ao corno dorsal da medula espinal. As informações térmicas cutâneas ascendem principalmente através do tracto espinotalâmico contralateral e chegam ao hipotálamo e córtex cerebral via mesencéfalo e tálamo. Na área pré-óptica anterior do hipotálamo, as informações térmicas são integradas e as respostas vasomotoras e cronotrópicas seguem pelas vias eferentes do simpático e parassimpático respectivamente (Ogawa T e Low P, 1993).

A elevação das pressões sistólica e diastólica em resposta ao frio tem sido descrita como ocorrendo em animais e humanos, compatível com estímulos simpáticos alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ). Os estímulos nervoso e humoral simpáticos que ocorrem durante o teste determinam vasoconstrição periférica (Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R e Nelson E, 1980; Finley JP, Bonet JF e Waxman MB, 1979) e hipertensão diastólica, compatíveis com estímulo alfa, enquanto a hipertensão sistólica é característica de estímulo beta (Finley JP, Bonet JF e Waxman MB, 1979). O teste de imersão da face estimula também uma resposta eferente parassimpática vagal que resulta em bradicardia (Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM e Skelton CL, 1975; Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R, Nelson E, 1980; Heath ME e Downey JA, 1990).

Heistad e colaboradores (Heistad DD, Abboud FM e Eckstein JW, 1968) revisam que em animais, a imersão das narinas parece iniciar um poderoso reflexo de mergulho através do estímulo aferente do trigêmeo. Subseqüente estímulo de quimiorreceptores contribui para o reflexo quando hipóxia e hipercapnia se desenvolvem. Quando totalmente completado, a resposta ao mergulho em animais consiste em intensa vasoconstrição periférica e bradicardia, a qual é independente de barorreceptores, diminuição do débito cardíaco e elevação da pressão venosa central. A pressão arterial é bem mantida apesar da queda do débito cardíaco. No experimento de Heistad, que utilizou o mergulho da face em água a 20 – 25 °C, a queda no fluxo sangüíneo no antebraço estava associada a uma elevação na pressão arterial, indicando que uma vasoconstrição ocorreu no antebraço. Uma vasoconstrição maior ocorreu nas digitais, onde uma queda no fluxo sangüíneo nos dedos era maior e mais abrupta que a diminuição do fluxo no antebraço.

No estudo de Finley e colaboradores (Finley JP, Bonet JF e Waxman MB, 1979), 9 nadadores competidores, com idades entre 12 e 19 anos, foram submetidos ao teste do frio na face, com imersão por 8 segundos, e identificaram a ocorrência de bradicardia e

hipertensão sistólica. Tais pacientes receberam posteriormente atropina e, em outro momento, propranolol, e foram submetidos novamente ao teste. Houve eliminação ou marcada atenuação da bradicardia no uso da atropina, o que concorda com a hipótese de que há estímulo vagal, e ocorreu redução da resposta hipertensiva em resposta ao uso do propranolol, beta-bloqueador. Outros estudos, com algumas variações na técnica de aplicação de frio na face, como bacias de água fria, vento frio ou no tempo de exposição, confirmam os achados de bradicardia e hipertensão ao longo do teste (Kawakami Y, Natelson BH e DuBois AB, 1967; Heistad DD, Abboud FM e Eckstein JW, 1968; Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R, Nelson E, 1980; Heath ME e Downey JA, 1990).

O teste do frio na face foi utilizado por Wildenthal e colaboradores (Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM e Skelton CL, 1975) como tratamento de taquicardia atrial paroxística. Sete pacientes com idades entre 22 e 66 anos com diagnóstico estabelecido por eletrocardiograma foram submetidos à imersão da face em água fria (2 °C) e obtiveram reversão do quadro de taquicardia. Os autores utilizaram tal procedimento com o objetivo de aumentar o tônus vagal, baseado em estudos de animais que eram submersos em água fria e apresentaram diminuição do débito e da frequência cardíaca e pressão arterial estável ou discretamente elevada.

Heath ME e Downey JA (1990) padronizaram o teste do frio na face. Testaram 16 indivíduos hígidos, com idades entre 21 e 35 anos, em diferentes tempos de exposição (20, 40, 60 e 120 segundos), locais de aplicação do frio na face (malares bilateral, frontal apenas, e malar unilateral) e temperaturas (0, 5, 10 e 15 °C). O ponto máximo de bradicardia ocorreu aos 40 segundos, havendo ainda redução marcada da frequência cardíaca aos 60 segundos. A aplicação de compressas a 0 °C foi mais efetiva que as aplicações unilateral ou frontal apenas. Houve redução da frequência cardíaca em todas as temperaturas testadas, mas de forma mais significativa com 0 °C. Desta forma, o

estudo indica que o uso de frio a 0 °C bilateralmente por um tempo mínimo de 60 segundos é o mais indicado para a avaliação da via trigêmeo-vago-coração e trigêmeo-simpático-musculatura vascular lisa.

Allen e colaboradores (Allen MT, Shelley KS e Boquet AJ Jr, 1992) compararam o uso do teste do frio na face com frio na mão de pessoas normais. Identificaram que ambos determinam hipertensão, porém o de frio na face leva a discreta bradicardia e na mão, a taquicardia. Os autores explicaram esta diferença na resposta da frequência cardíaca: enquanto o estímulo na face produz um estímulo vagal mais definido, padrões autonômicos distintos estão presentes no frio na mão. O padrão geral, porém, seria primariamente de resposta  $\alpha$ -adrenérgica com um mínimo envolvimento  $\beta$ -adrenérgico.

Alguns pesquisadores têm apontado a dor causada pelo frio como um dos aspectos responsáveis pela resposta simpática aos testes do frio na face e na mão (Allen MT, Shelley KS e Boquet AJ Jr, 1992; Luft D, Lay A, Benda N, Kort C, Hofmann V, Hardin H e Renn W, 1996). Heath ME e Downey JA (1990), ao utilizarem diferentes temperaturas e tempos de duração do teste, identificaram que vários indivíduos que se submeteram ao teste consideraram que a temperatura baixa mantida por 120 segundos foi desconfortável ou até dolorosa.

Estudos realizados em diabéticos demonstraram que havia diferenças na resposta ao frio entre esses e os não diabéticos. Friedman e colaboradores (Friedman HS, Sacerdote A, Bandu I, Jubay F, Herrera AG, Vasavada BC e Bleicher SJ, 1984) compararam pacientes diabéticos com não diabéticos e identificaram que os primeiros tinham uma resposta pressórica menor ao estímulo com frio, mão imersa em água fria por 30 segundos, e taquicardia ao invés da bradicardia que ocorria nos não diabéticos. Alterações da função cardíaca como fração de ejeção e aumento do volume diastólico final observados com o teste em normais eram de menor intensidade em diabéticos. O aumento da frequência cardíaca foi compreendido como anormalidades da resposta

simpático-adrenérgica (ação simpática sem oposição - neuropatia do parassimpático). Já as outras anormalidades cardiovasculares não foram correlacionadas a uma neuropatia autonômica diabética, uma vez que nenhum diabético apresentava taquicardia de repouso, e um aumento da frequência cardíaca foi identificada ao estresse (frio) ao invés de ausência de responsividade, critérios esses (taquicardia de repouso e irresponsividade da FC ao frio) que são, segundo o autor, sinais precoces de neuropatia diabética. Hoje é reconhecido que a neuropatia diabética pode ter manifestações provavelmente mais sutis e para seu reconhecimento são necessários testes como, por exemplo, análise da variação da frequência cardíaca durante a respiração ou ao assumir a posição supina, os quais podem expressar neuropatia em suas formas iniciais (Pfeifer M, 1999).

Luft e colaboradores (Luft D, Lay A, Benda N, Kort C, Hofmann V, Hardin H e Renn W, 1996) realizaram teste pressórico com frio em um grupo de pacientes com DM1 e em outro sem diabetes na tentativa de identificar se haveria alteração na sensação de dor e respectiva alteração de resposta pressórica. O teste foi realizado com imersão da mão por 5 minutos em água gelada. Os pacientes diabéticos foram considerados não neuropatas autonômicos através de testes cardiovasculares e alguns apresentaram alterações microangiopáticas (retinopatia e microalbuminúria). Estas alterações microvasculares não foram levados à discussão no estudo. O teste de percepção vibratória realizado com diapásio (128 Hz), apesar de normal em ambos os grupos, foi significativamente menor em 1/8 dos diabéticos ( $p < 0,0002$ ). As pressões arteriais sistólica, diastólica e média ao longo do teste foram diferentes entre os grupos, sendo os diabéticos menos responsivos (amplitude de resposta menor). A percepção de dor não foi diferente entre os grupos. Fica a questão: tais pacientes não poderiam apresentar já algum grau de neuropatia, uma vez que a sensibilidade vibratória já era alterada em relação aos normais?

Luft e colaboradores (Luft D, Maisch C, Hofmann-Krück V, Radjaipour M e Häring HU, 2000), partindo de estudos que consideraram que diabéticos respondem menos ao frio, às vezes, mas não sempre, com um aumento de pressão arterial em relação a pacientes normais, realizou o teste do frio em controles e diabéticos e mediu valores de glicemia, insulina e catecolaminas séricas, na tentativa de explicar esta diferença. A neuropatia clínica foi excluída por história, reflexo aquileu, exame sensitivo. O teste do frio foi realizado com imersão da mão por 5 minutos em água gelada e as catecolaminas foram coletadas antes e logo após o teste. Os testes autonômicos foram normais em ambos os grupos, mas foi significativamente diferente o coeficiente de variação de taquicardia-bradicardia em repouso, menor nos pacientes com diabetes. As pressões arteriais variaram ao longo do teste, mas não foram diferentes entre os grupos, e a frequência cardíaca elevou-se significativamente em controles, mas não em diabéticos. Em controles, a concentração de adrenalina e noradrenalina elevou-se significativamente; em diabéticos, a já elevada concentração de adrenalina não aumentou, porém a concentração de noradrenalina se comportou como em controles. Não houve diferença entre mudanças nas catecolaminas e mudanças na pressão arterial, nem em diabéticos nem em controles, assim como não houve correlação entre controle glicêmico e variação da pressão arterial. Os autores concluíram que, em controles e pacientes diabéticos tipo 1, a concentração de noradrenalina venosa aumenta significativamente durante o teste pressórico ao frio na mão e que o teste tem demonstrado evocar um aumento consistente em noradrenalina, mas não de adrenalina. Concluem também que o teste do frio é complexo e possui diversos aspectos que podem variar consideravelmente, tais como: débito cardíaco, resistência periférica total, resposta pressórica, concentração de catecolaminas e atividade muscular simpática.

Stornello e colaboradores (Stornello M, Valvo EV, Distefano M, Golino M, Cocuzza F, Vasques E, Modicano V, Leone S e Giustolisi V, 1995) realizaram teste de frio em 12

pacientes não diabéticos com e 12 sem hipertensão e 12 diabéticos tipo 2 com e 12 sem hipertensão. Utilizaram como prova a imersão da mão em água gelada por 90 segundos e avaliaram a frequência cardíaca e a pressão arterial antes, durante (30 e 90 seg) e após o teste (5 min). Utilizaram a pressão arterial média ( $PAM = [2 \times PA \text{ diastólica} + PA \text{ sistólica}] / 3$ ) como parâmetro para efeito de cálculos. O teste do frio induziu respostas semelhantes nos grupos estudados, tanto na elevação da PA quanto de FC.

Tanto com a infusão de acetilcolina (Ach) (Horio Y, Yasue H, Rokutanda M, Nakamura N, Ogawa H, Takaoka K, Matsuyama K e Kimura T, 1986; Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E e Attali J-R, 1993), como também durante o teste pressórico com frio (Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW e Selwyn AP, 1988; Grambow D, Dayanikli F, Muzik O, Sutor R, Rubenfire M, Werns S e Schwaiger M, 1993), o qual acredita-se que produza ativação simpática (Neill 1974; Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW e Selwyn AP, 1988; Grambow D, Dayanikli F, Muzik O, Sutor R, Rubenfire M, Werns S e Schwaiger M, 1993), têm sido observadas respostas vasoconstritoras em pacientes não diabéticos com disfunção endotelial secundária a aterosclerose coronariana. Em indivíduos saudáveis, a ativação simpática induzida pelo teste pressórico com frio produz um aumento de 65% no fluxo sanguíneo coronariano quando avaliada por estudos invasivos com doppler (Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW e Selwyn AP, 1988), ou um aumento de 18% no fluxo sanguíneo miocárdico quando avaliada por PET usando N-13 amônia (Grambow D, Dayanikli F, Muzik O, Sutor R, Rubenfire M, Werns S e Schwaiger M, 1993). Como em cães e pessoas normais (Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW e Selwyn AP, 1988), a ativação simpática ou a infusão de Ach (Levy 1969, Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E e Attali J-R, 1993) resulta em vasodilatação coronariana, nossa hipótese é a de que a disfunção endotelial do Diabetes ou a aterosclerose poderiam limitar a liberação de NO e prostaciclina permitindo que agonistas adrenérgicos e/ou endotelina provoquem

vasoconstrição (Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW e Selwyn AP, 1988; Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E e Attali J-R, 1993).

Em pacientes não diabéticos, um dos testes recentemente propostos para avaliar a resposta endotelial a um estímulo simpático é a medida do fluxo coronariano (através de PET scan com  $^{13}\text{N-NH}_3$ , por exemplo) após imersão dos pés em água fria (teste pressórico com frio). Em pacientes com NAD, como a imersão dos pés em água fria está contra-indicada pela chance de aumentar a isquemia em áreas com fluxo sanguíneo comprometido e de determinar lesão cutânea pela insensibilidade, não seria recomendável e ético realizar o referido teste com vistas a provocar um estímulo simpático. Por outro lado, mesmo que não contra-indicado, esse teste não deveria determinar estímulo simpático na NAD, pois a inervação periférica dos membros inferiores é a primeira a ser comprometida no Diabetes. A inervação da face e da cabeça costumam ser as últimas a serem lesadas pela neuropatia do Diabetes (Low PA and Fealey RD, 1999), de modo que teoricamente poder-se-ia esperar uma resposta clara mesmo em pacientes com diabetes de longa duração.



## **OBJETIVOS**

Padronizar as respostas da frequência cardíaca e da pressão arterial de indivíduos sem Diabetes ao teste do frio na face, assim como avaliar a resposta em pacientes com Diabetes sem e com microvasculopatia.

**Objetivo secundário:** Avaliar a possibilidade de que pacientes sem e com complicações microvasculares apresentem diminuição ou aumento das atividades simpática e parassimpática em relação ao teste dos indivíduos normais.

## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- Allen MT, Shelley KS, Boquet AJ Jr. *A comparison of cardiovascular and autonomic adjustments to three types of cold stimulation tasks.* Int.J Psychophysiol 1992, 13 (1): 59-69
- Allmann KC, Stevens MJ, Wieland DM, Hutchins GD, Wolfe ER, Greene DA, Schwaiger M. *Noninvasive assessment of cardiac diabetic neuropathy by carbon-11 hydroxyephedrine and positron emission tomography.* J Am Coll Cardiol 1993, 22:1425-32
- American Diabetes Association, American Academy of Neurology. *Consensus statement: report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy.* Diabetes Care 1988, 11:592-97
- American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care 2004, 27: S5-S10
- Arnold RW, Dyer JA, Gould AB, Hohenberger GG, Low PA. *Sensitivity to vasovagal maneuvers in normal children and adults.* Mayo Clin Proc 1991, 66: 797 – 804
- Bennett T, Hosking DJ, Hampton JR. *Cardiovascular control in diabetes mellitus.* BJM 1975, 2: 585 – 87
- Clarke CF, Eason M, Reilly A, Boyce C, Werther GA. *Autonomic nerve function in adolescents with type 1 diabetes mellitus: relationship to microalbuminuria.* Diabet Med 1999, 16 (7): 550 – 54
- Clark CM, Lee DA. *Prevention and Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus.* N Engl J Med 1995; 332:1210-17
- Dyck JB and Dyck PJ. *Diabetic Polyneuropathy* in Diabetic Neuropathy ed. by Peter J Dick, PK Thomas – 2<sup>nd</sup> ed, Saunders Company ed, EUA, 1999

- Ewing JD, Campbell IW, Clarke BF. *The natural history of diabetic autonomic neuropathy*. Quart J Med 1980, 49 (193): 95-108
- Ewing DJ, Clarke BF. *Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy*. Br Med J 1982, 285: 916-18
- Ferris FL, Davis MD, Aiello LM. *Treatment of Diabetic Retinopathy*. N Engl J Med 1999; 341:667-78
- Finley JP, Bonet JF, Waxman MB. *Autonomic pathways responsible for bradycardia on facial immersion*. J Appl Physiol 1979, 47(6): 1218-22
- Friedman HS, Sacerdote A, Bandu I, Jubay F, Herrera AG, Vasavada BC, Bleicher SJ. *Abnormalities of the cardiovascular response to cold pressor test in type 1 diabetes*. Arch Intern Med 1984, 144: 43-47
- Giannini C, Dyck PJ. *Ultrastructural morphometric abnormalities of sural nerve endoneurial microvessels in diabetes mellitus*. Ann Neurol 1994, 36:408-15
- Grambow D, Dayanikli F, Muzik O, Sutor R, Rubenfire M, Werns S, Schwaiger M. *Assessment of endothelial function with PET cold pressor test in patients with various degrees of coronary atherosclerosis*. J Nucl Med 1993, 34: A137
- Greene DA, Sima AAF, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. *Complications: neuropathy, pathogenetic considerations*. Diabetes Care 1992, 15 (12): 1902-25
- Heath ME, Downey JA. *The cold face test (diving reflex) in clinical autonomic assessment: methodological considerations and repeatability of responses*. Clin Sci 1990, 78: 139-47
- Heistad DD, Abboud FM, Eckstein JW. *Vasoconstrictor response to simulated diving in man*. J Appl Physiol 1968, 25 (5): 542-49
- Horio Y, Yasue H, Rokutanda M, Nakamura N, Ogawa H, Takaoka K, Matsuyama K, Kimura T. *Effects of intracoronary injection of acetylcholine on coronary arterial diameter*. Am J Cardiol 1986, 57: 984-89

- Kahn JK, Sisson JC, Vinik AI. *QT interval prolongation and sudden cardiac death in diabetic autonomic neuropathy*. J Clin Endoc Metab 1987, 64(4):751-54
- Kawakami Y, Natelson BH, DuBois AB. *Cardiovascular effects of face immersion and factors affecting diving reflex in man*. J Appl Physiol 1967, 23(6):964-70
- Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R, Nelson E. *Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem-vagal function in humans*. Ann Neurol 1980, 7: 144-49
- Krolewski AS, Barzilay J, Warram JH, Martin BC, Pfeifer M, Rand LI. *Risk of early-onset proliferative retinopathy in IDDM is closely related to cardiovascular autonomic neuropathy*. Diabetes 1992, 41 (4): 430 - 37
- Levy MN, Zieske H. *Comparison of the effects of vagus nerve stimulation and of acetylcholine infusions*. Am J Physiol 1969, 216 (4): 890-97
- Lindmark S, Wiklund U, Bjerle P, Eriksson JW. *Does the autonomic nervous system play a role in the development of insulin resistance? A study on the heart rate variability in first-degree relatives of type 2 diabetes patients and control subjects*. Diabetic Medicine 2003, 20: 399-405
- Low PA and Fealey RD. *Sudomotor Neuropathy in Diabetic Neuropathy* ed. by Peter J Dick, PK Thomas – 2<sup>nd</sup> ed, Saunders Company ed, EUA, 1999
- Lown B, Verrier RL. *Neural activity and ventricular fibrillation*. N Eng J Med 1976, 294 (21):1165-70 (3)
- Luft D, Lay A, Benda N, Kort C, Hofmann V, Hardin H, Renn W. *Pain intensity and blood pressure reactions during a cold pressor test in IDDM patients*. D Care 1996, 19 (7): 722-25
- Luft D, Maisch C, Hofmann-Krück V, Radjaipour M, Häring HU. *Correlates of venous catecholamine concentrations in patients with type 1 diabetes during a cold pressor test*. Clinical Auton Research 2000, 10: 131-37

- Massin MM, Derkenne B, Tallsund M, Rocour-Brumioul D, Ernould C, Lebrethon MC, Bourguignon JP. *Cardiac autonomic dysfunction in diabetic children*. Diabetes Care 1999, 22 (11): 1845 – 50
- Ministério da Saúde - Fundação Nacional da Saúde – <http://www.funasa.gov.br>
- Mohrman DE, Feigl EO. *Competition between sympathetic vasoconstriction and metabolic vasodilation in the canine coronary circulation*. Circ Res 1978, 42 (1): 79-86
- Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW, Selwyn AP. *Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test*. Circulation 1988, 77 (1): 43-52
- Navarro X, Kennedy WR, Loewenson RB, Sutherland DER. *Influence of pancreas transplantation on cardiorespiratory reflexes, nerve conduction, and mortality in diabetes mellitus*. Diabetes 1990, 39: 802-06
- Neill WA, Duncan DA, Kloster F, Mahler DJ. *Response of coronary circulation to cutaneous cold*. Am J Med 1974, 56: 471-76
- Neumann C, Schmid H. *Relationship between the degree of cardiovascular autonomic dysfunction and symptoms of neuropathy and other complications of diabetes mellitus*. Braz J Med Biol Res 1995, 28: 751-57
- Neumann C, Schmid H. *Standardization of a computerized method for calculating autonomic function tests responses in healthy subjects and patients with diabetes mellitus*. Braz J Med Biol Res 1997, 30: 197-205
- Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali J-R. *Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilatation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function*. Diabetes 1993, 42: 1017-25
- O'Brien IA, McFadden JP, Corral RJM. *The influence of autonomic neuropathy on mortality in insulin dependent diabetes*. Q J Med 1991, 79 (290): 495-502

- Ogawa T, Low P. *Autonomic regulation of temperature and sweating*. In Clinical Autonomic Disorders ed Low P 79 -104m Little Braw Co, 1993
- Pecis M, Azevedo MJ, Moraes RS, Ferlin EL, Gross JL. *Autonomic dysfunction and urinary albumin excretion rate are associated with an abnormal blood pressure pattern in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients*. Diabetes Care 2000, 23(7): 989-93
- Pfeifer M. *Cardiovascular assessment*, In Diabetic Neuropathy, ed Dick PD; Thomas, PK p 171 – 83 W Saunders, 1999
- Schmid H, Schaan B, Ceconello F, Maestri T, Neumann C. *Proliferative diabetic retinopathy is related to cardiovascular autonomic neuropathy in NIDDM*. Diabetes Res Clin Prac 1995, 29: 163-68
- Schmid H, Forman LA, Cao X, Sherman OS, Stevens MJ. *Heterogeneous cardiac sympathetic denervation and decreased myocardial nerve growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats*. Diabetes 1999, 48:603-08
- Schmid H, Neumann C, Brugnara L. *Diabetes and polyneuropathy of the lower limbs in the perspective of diabetologists*. J Vasc Br 2003, 2 (1): 37- 48
- Schwartz PJ, Vanoli E, Stramba-Badiale M, De Ferrari GM, Billman GE, Foreman RD. *Autonomic mechanisms and sudden death: new insights from analysis of baroreceptor reflexes in conscious dogs with and without myocardial infarction*. Circulation 1988, 78(4): 969-79
- Stevens MJ, Raffel DM, Allman KC, Dayanikli F, Ficaro E, Stanford T, Wieland DM, Pfeifer MA, Schwaiger M. *Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes – implications for enhanced cardiovascular risk*. Circulation 1998, 98:961-68
- Stornello M, Valvo EV, Distefano M, Golino M, Cocuzza F, Vasques E, Modicano V, Leone S, Giustolisi V. *Influence of glucose load on cardiovascular and humoral responses to a cold pressure test*. J Hum Hypert 1995, 9: 93-95

- Sundkvist G, Lilja B. *Autonomic neuropathy predicts deterioration in glomerular filtration rate in patients with IDDM*. Diabetes Care 1993, 16 (5): 773 - 79
- Taylor AA. *Pathophysiology of endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus*. Endoc Metab Clin N Am, 2001; 30 (4): 983 – 97
- Treiber FA, Musante L, Braden D, Arensman F, Strong W, Levy M, Leverett S. *Racial differences in hemodynamic responses to the cold face stimulus in children and in adults*. Psychosom Med (1990) 52: 286 - 96
- Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB. *Diabetic neuropathies*. Diabetes Care 1992, 15 (12): 1926 - 75
- Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL. *Diabetic neuropathies*. Diabetologia, 2000; 43: 957-73
- Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Freeman R. *Diabetic autonomic neuropathy*. Diabetes Care 2003, 26(5): 1553 – 79
- Vörös P, Lengyel Z, Nagy V, Németh C, Rosivall L, Kammerer L. *Diurnal blood pressure variation and albuminuria in normotensive patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Nephrol Dial Transplant 1998, 13: 2257-60
- Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM, Skelton CL. *The diving reflex used to treat paroxysmal atrial tachycardia*. Lancet 1975, i: 12–14
- Young MA, Knight DR, Vatner SF. *Autonomic control of large coronary arteries and resistance vessels*. Progress in Cardiovascular Diseases 1987, 30: 211-34

## Artigo 1

**Heart rate and blood pressure responses of healthy subjects to the cold face test**

Brugnara L <sup>1</sup>, Chiyoshi C <sup>2</sup>, Neumann C <sup>3</sup>, Miura M <sup>4</sup>, Traiber C <sup>5</sup>, Schmid H <sup>6</sup>

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) / Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA)

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas / Faculdade de Medicina / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) / Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

1. HCPA / ISCMPA / UFRGS
2. UFRGS
3. ISCMPA / UFRGS
4. UFRGS
5. UFRGS
6. HCPA / ISCMPA / UFRGS / FFFCMPA

Research supported by CNPq and FAPERGS



**Abstract**

The aim of the present study was to standardize the heart rate and blood pressure responses to the cold face test, which leads to an autonomic neurological response. Forty-nine apparently healthy subjects (18 males, 36.7%), 22 – 56 years, participated. They had ice bags applied to their frontal and malar regions for 120 seconds while their heart rate and blood pressure were measured. Maximum bradycardia occurred between 40 s and 60 s, systolic blood pressure increased to its maximum between 40 s and 90 s, and a maximum diastolic blood pressure increase was observed at 20 s. There was no difference in the slope of the curves related to gender, but males presented a lower mean heart rate ( $p = 0.01$ ). Individuals who were younger than 30 years old had lower systolic blood pressure increases in response to the test in comparison with individuals who were over 40 ( $p = 0.012$ ).

Key words: cold face test; control individuals; standardization; autonomic activity

## Introduction

A heart rate and a blood pressure response to exposition of the face to cold have been described for several decades. Initially, it was defined as a physiological response of swimmers and divers when they immersed all the body in cold water (diving reflex). Later, some studies showed that by immersing only the face, without getting the whole body wet, the same physiological effect was observed (1). In 1980, Khurana and collaborators (2) found out that a similar effect might be observed when the assessment was performed with the application of cold to the face without immersion and without interference of apnea or diving discomfort. Today this cold face test has been used to provoke a sympathetic autonomic neurological response of vessels (3).

An increase in both systolic and diastolic pressure in response to cold has been observed in animals and in human beings, and it is compatible with alpha ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ) sympathetic stimuli. The nervous and humoral sympathetic stimuli that occur during the test determine peripheral vasoconstriction (2, 4) and diastolic hypertension, which are compatible with alpha stimulus, whereas systolic hypertension is a characteristic of a beta response (4). The immersion of the face also stimulates a vagal efferent parasympathetic pathway and the result is bradycardia (2, 5-6). In some studies in which the purpose was to obtain a sympathetic response, the cold hand test has also been used. It causes a characteristic response of sympathetic stimulus only (7-9).

Different sites for cold applications, different application temperatures and different cold exposure times have been used in the studies that describe the responses to the cold test. Heath and Downey (6) have standardized the cold face test by experimenting several variations and after evaluating the results; they suggested that cold application at 0° C to both malar regions for a minimum period of 60 seconds would be the best choice for

obtaining the desired autonomic response. Those studies have assessed heart rate and blood flow responses, but not the blood pressure. According to Arnold (10), the cold face test causes a larger heart rate variation in younger individuals, but there is no difference of responses related to gender.

Some researchers have also pointed out that the pain caused by cold is one of the factors that account for the sympathetic response to cold face and hand tests (7-8). Heath and Downey (6), by using different temperatures and exposition times, found out that several individuals who were submitted to the test considered that the low temperature for a 120-second period was uncomfortable or even painful.

In this study, our purpose was to standardize in healthy, non-diabetic, non-hypertensive individuals, the heart rate and blood pressure responses to the cold face test. Such standardization might be useful for assessing subjects who require a non-invasive sympathetic stimulus as well as for defining if subjects have autonomic neurological dysfunction.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Subjects**

In order to carry out the cold face test, 49 healthy people (18 males, 31 females) were recruited among the parents of pediatric patients attending the hospital and other volunteers who knew they did not have Diabetes Mellitus because of a glycemetic evaluation in the last three months, and because they did not have a family history of Diabetes Mellitus. These individuals were non-hypertensive, with Body Mass Index lower than 25, and ages ranging from 20 to 56 years old.

## Methods

### *Cold face test*

Cold was applied to the face in order to produce sympathetic activation as described by Heath and Downey (6). After resting in supine position for 30 minutes, the patients had both sides of their frontal and malar regions covered with three ice water rubber bags for a 2-minute period (6-11). Blood pressure was measured in baseline conditions and during the test at – 10, 0, 10, 20, 40, 60, 90 and 120 s.

Heart rate (HR) and cardiac output were assessed through continuous cardiac monitoring, and HR was recorded at the times indicated above. In order to obtain the results more rapidly and accurately, the patient was monitored with 2 digital sphygmomanometers (both right and left arms), and values were alternately obtained (blood pressure at – 10 s in the right arm, at 0 s in the left arm, at 10 s in the right arm, and so on).

Three evaluators participated in the test: the first and the second evaluators were controlling and recording heart rates and blood pressures (in both arms), while the third evaluator was following the continuous cardiac monitoring and coordinating time and blood pressure measures.

### *Preparation of subjects for the cold face test*

All subjects were asked not to take any medication during 48 hours prior to the test. They were given instructions to suspend any ingestion of caffeine at least 24 hours before the test. All subjects were studied in the period between 4 p.m. and 8 p.m. Before the test was started, the patients rested in supine position for 30 minutes in a temperature-controlled room (24° – 25° C).

## Statistical Analysis

We have standardized the responses of the control individuals as normal responses, by organizing them in curves of percentiles of 5, 10, 25, 50, 75, 90 and 95. For correlation of maximum differences from the initial points (maximum responses) and age, Pearson's linear correlation was used.

For comparisons between the baseline levels of heart rate and systolic and diastolic pressure with the values obtained for responses, analysis of variance tests for repeated measures (twoway ANOVA) were performed. In order to evaluate the variation related to the baseline values (variation of points throughout time) of the curves of heart rate and systolic and diastolic blood pressure, the evaluation between subjects, Greenhouse – Geisser test, was used. Values estimated by arithmetical mean based on the results obtained in all of the six responses over 120 s (10, 20, 40, 60, 90 and 120s) were considered as mean points of the curves. The between-subjects test was used for comparing mean points of the curves. Components of interaction within subjects (within-subjects test – Greenhouse – Geisser) were studied in order to evaluate differences among the slope of the curves.

The significance level considered in this study was  $P < 0.05$ .

## Results

Forty-nine subjects (18 males – 36.7%; 31 females – 63.3%) with ages ranging from 20 to 56 years (mean  $32.8 \pm 10.2$ ) were assessed.

a) Results of assessment of heart rates before and after facial cooling:

Baseline heart rate was 70 beats per minute (bpm)  $\pm$  9.3. Parameters obtained for heart rate were organized in percentiles, which are shown in Figure 1.

Throughout the cold face test there was HR values variation related to the baseline values (ANOVA,  $p = 0,003$ ). Heart rate presented a mean descent of  $8.5 \pm 8.1$  in relation to baseline, ranging from 0 to 32 beats. The maximum descent was observed between 40 and 60 seconds of testing, ranging from 0 to 32 bpm; the responses corresponding to percentiles 5 and 90 were 0 and 28 bpm, respectively.

In the analyses performed with the purpose to check possible differences related to gender, no slope differences were observed between the responses of curves over 120 s ( $p = 0.18$ ). There was some difference when they were compared to the mean points of the curve corresponding to females in comparison to males ( $p = 0.01$ ). The response for male heart rate mean was lower than those recorded for females (Figure 2).

There was no correlation between response of heart rate and age ( $r = - 0.171$ ;  $p < 0.24$  – Pearson). For assessment of responses of heart rate according to different age groups, the subjects were divided into three groups: 20 – 29 years (20 subjects), 30 –39 years (15 subjects) and with 40 years or over (14 subjects). In the analyses carried for the age groups proposed there were no differences between the slopes of curves over 120 seconds ( $p = 0.9$ ). When the mean points of curves of different age groups were compared no significant differences were found either ( $p = 0.44$ ).

b) Results of the assessments of systolic blood pressure before and after facial cooling:

The mean of baseline systolic blood pressure was  $114.3 \pm 13.4$  (mmHg). The responses to the cold face test obtained for systolic blood pressure (SBP) are presented in Figure 3.

There was SBP values variation throughout the cold face test related to the baseline values (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Systolic blood pressure showed a maximum response between 40 and 90 seconds of testing, with a mean increase of  $24.8 \pm 13.7$  mmHg in relation to baseline, ranging from 6 to 69 mmHg. The response corresponding to percentiles 5 and 95 was an increase of 6 and 55 mmHg, respectively.

In the analyses carried out to evaluate the possibility of differences between the response slopes of the curves for both male and female individuals, there was no difference ( $p = 0.76$ ) over 120 seconds. As occurred for the difference of mean points of the curve in relation to baseline, no differences were noticed ( $p = 0.45$ ).

There was a weak correlation of maximum responses of systolic blood pressure with age ( $r = 0.36$ ;  $p < 0.000$  – Pearson). In analyses for the age groups proposed (20 – 29 years, 30 – 39 years, and 40 years or over), no differences were shown among the response slopes of curves over 120 seconds ( $p = 0.29$ ). As to the difference of mean points of the curves corresponding to the age groups, there was a significant difference ( $p = 0.012$ ). In a paired evaluation with Bonferroni's correction test for mean points of responses, a lower response of systolic blood pressure was observed in subjects from 20 to 29 years versus those with 40 years or over,  $p = 0.013$ ; in subjects from 20 to 29 years versus individuals from 30 to 39 years,  $p = 0.13$ ; and in subjects from 30 to 39 years versus subjects with 40 years or over,  $p = 1$ . These results show that the difference among means of curves were due to the difference among subjects who were younger than 30 years old in comparison with the ones who were 40 or over, and the younger subjects had lower responses of systolic blood pressure (Figure 4).

c) Results of assessments of diastolic blood pressure before and during facial cooling:

Baseline diastolic blood pressure (DBP) presented a mean of  $69.6 \pm 9.4$  (mmHg). The parameters obtained in response to the cold face test were organized in percentiles, as Figure 5 shows.

There was DBP values variation throughout the cold face test related to the baseline values (ANOVA,  $p < 0,001$ ). As to the baseline value, there was a maximum increase from 20 seconds, which enables us to describe the curve as a plateau after that point. The mean increase obtained in diastolic pressure was  $19.7 \pm 10.1$  mmHg, ranging from 3 to 62 mmHg in that sample. The percentiles 5 and 95 of normal responses were 6.5 and 39 mmHg, respectively.

In the analyses carried out for females and males, there was no difference among response slopes of curves over 120 seconds ( $p = 0.77$ ). In the comparison of mean points of curves for gender, no differences were found ( $p = 0.127$ ).

There was no correlation between the response of diastolic blood pressure and the ages ( $r = - 0.02$ ;  $p < 0.89$  – Pearson). In the age stratification (20 – 29 years, 30 – 39 years, and 40 years or over), no differences among response behaviors of curves over 120 seconds ( $p = 0.98$ ) were found, neither were they found among mean points of all the three curves ( $p = 0.08$ ).



## Discussion

The cold face test has been described for several decades as a complex cardiovascular stimulus that results in peripheral vasoconstriction, decreased cardiac output and heart rate, and either blood pressure maintenance or its slight increase (2, 4-6, 12). The test allows the performance of a simultaneous sympathetic and vagal reaction in a quick and non-invasive way. We attempted to define normal responses to the test by studying 49 control individuals, since the results presented in literature have varied widely, that is, some authors have reported a blood pressure increase (1, 4, 7-9, 12-13) while others have not.

We have identified, as Wildenthal (5) and Heath (13), that heart rate presents a descent that reached its maximum between 40 and 60 seconds and tends to return to baseline at the end of the test. Kawakami (1) and Heistad (13) limited the duration of the test to a shorter period (30 seconds) and identified bradycardia from 15 and 20 seconds, respectively. Finley (4) and Khurana (2) have also reported bradycardia, but without pointing out the right moment of descent. In our study, we have found that the heart rate slope was of the same kind in males and females, but it is lower in males (Figure 2). Decreased results were observed for males at the mean point of the heart rate curves and were also described by Allen (7). By stratifying individuals by age, no differences in response behavior of heart rate were found, nor were any differences found among mean points of the curves.

Systolic blood pressure had a maximum response between 40 and 90 seconds. Diastolic blood pressure also showed a maximum increase from 20 seconds in relation to the baseline value, describing a plateau up to that point. Studies by Kawakami (1) and Heistad (13) have identified an increase in systolic and diastolic blood pressure from the middle to the end of the test (30-second test). Treiber (12) carried out the cold face test in

a 180-second period and identified increased systolic and diastolic pressure at 80 – 90 seconds, with a tendency towards recovery at 180 seconds. In our study, we have concluded that systolic and diastolic blood pressure levels have the same slope as well as the same mean values for both males and females. By stratifying individuals according to age, no difference was noticed in the response slope of systolic and diastolic blood pressure values. Individuals who were younger than 30 years old, however, had lower values of responses of systolic blood pressure in comparison to individuals who were 40 or older (Figure 6).

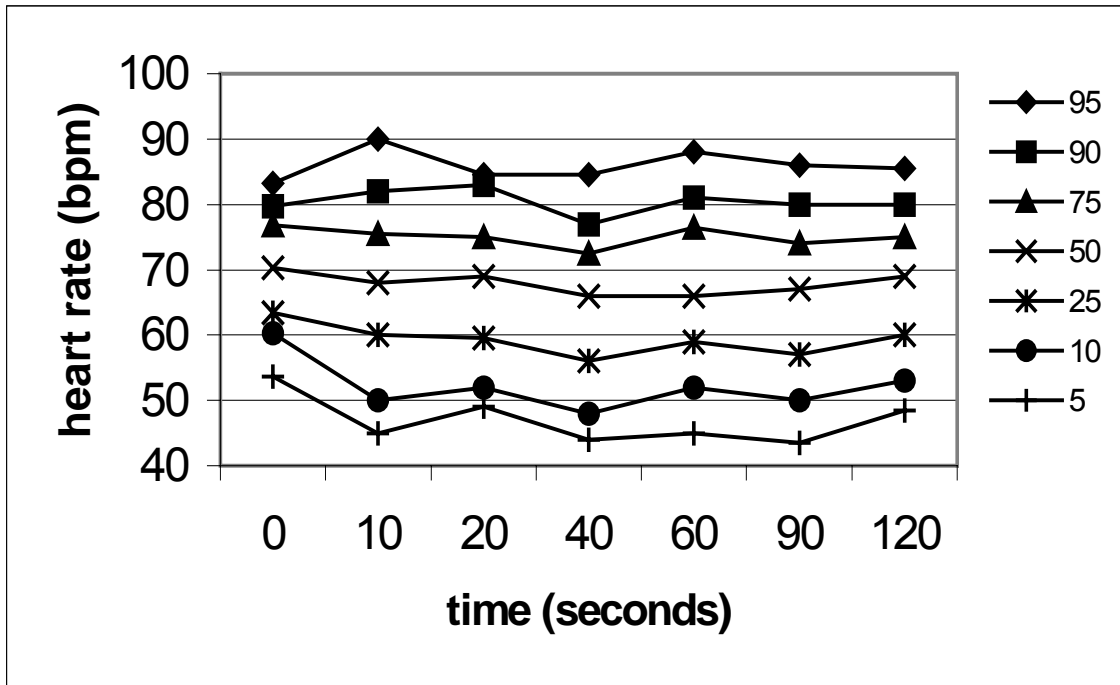
Variations in the autonomic response have been related to age in other studies. Neumann and Schmid (14) conducted a standardization of results of cardiovascular autonomic tests. They have found that individuals younger than 30 years present with a larger variation when heart rate was measured during the deep breath. This maneuver tests the parasympathetic function, which might be more preserved in younger individuals. Kennedy (15) has also carried out cardiovascular tests of predominantly parasympathetic responses and has reported that younger individuals respond with wider variability.

Since autonomic responses to the facial cooling were defined for healthy subjects in the present study, both heart rate and blood pressure deviations from these normal results might indicate autonomic dysfunction.

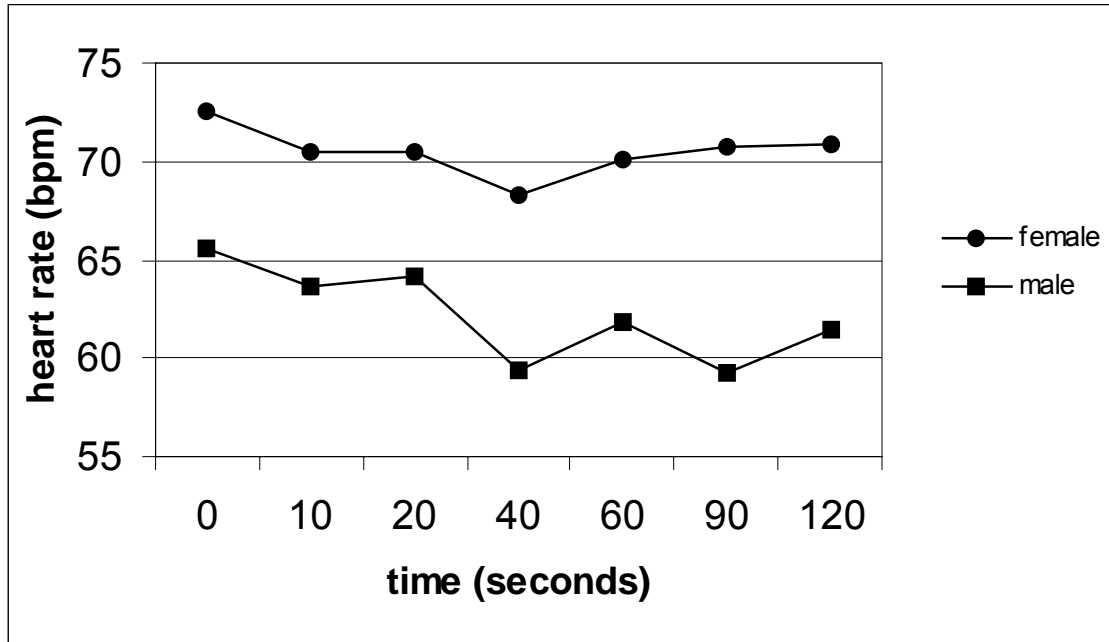
## References

1. Kawakami Y, Natelson BH & DuBois AB (1967). Cardiovascular effects of face immersion and factors affecting diving reflex in man. *Journal of Applied Physiology*, 23(6): 964-70
2. Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R & Nelson E (1980). Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem-vagal function in humans. *Annals Neurology*, 7: 144-49
3. Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW & Selwyn AP (1988). Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test. *Circulation*, 77 (1): 43-52
4. Finley JP, Bonet JF & Waxman MB (1979). Autonomic pathways responsible for bradycardia on facial immersion. *Journal of Applied Physiology*, 47(6): 1218-22
5. Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM & Skelton CL (1975). The diving reflex used to treat paroxysmal atrial tachycardia. *Lancet* i: 12 -14
6. Heath M E & Downey J A (1990). The cold face test (diving reflex) in clinical autonomic assessment: methodological considerations and repeatability of responses. *Clinical Science*, 78: 139-147
7. Allen MT, Shelley KS & Boquet AJ Jr (1992). A comparison of cardiovascular and autonomic adjustments to three types of cold stimulation tasks. *International Journal of Psychophysiology*, 13 (1): 59-69
8. Luft D, Lay A, Benda N, Kort C, Hofmann V, Hardin H & Renn W (1996). Pain intensity and blood pressure reactions during a cold pressor test in IDDM patients. *Diabetes Care*, 19 (7): 722-25
9. Luft D, Maisch C, Hofmann-Krück V, Radjaipour M & Häring HU (2000). Correlates of venous catecholamine concentrations in patients with type 1 diabetes during a cold pressor test. *Clinical Autonomic Research*, 10: 131-37

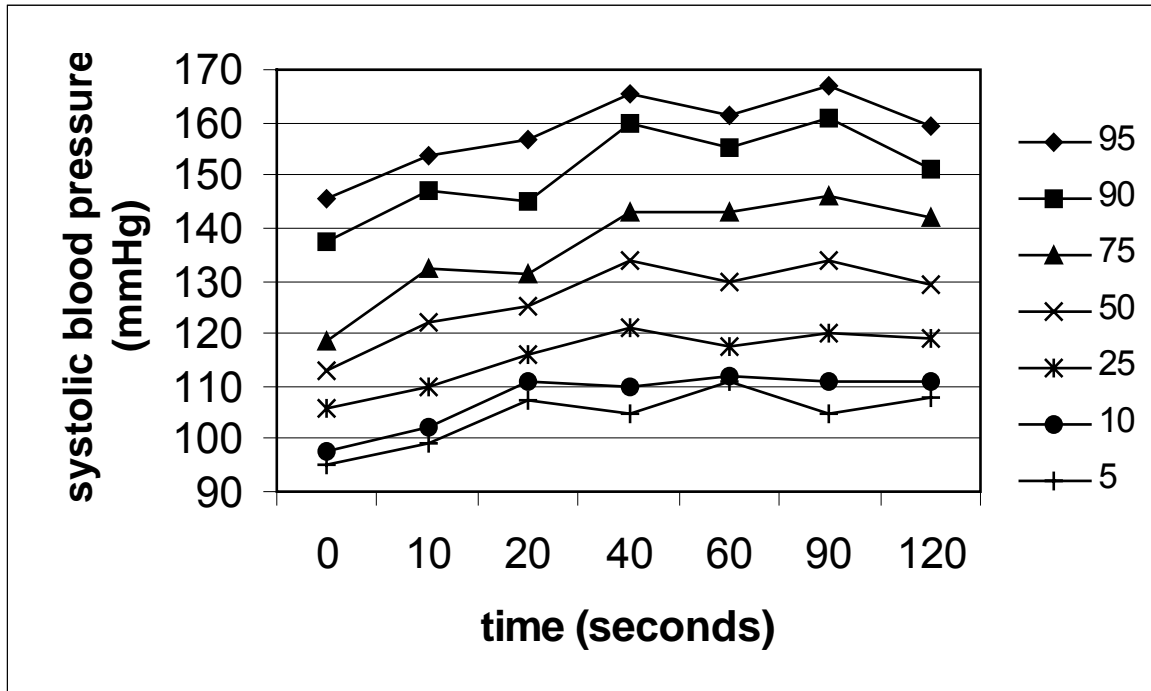
10. Arnold RW, Dyer JA, Gould AB, Hohenberger GG & Low PA (1991). Sensitivity to vasovagal maneuvers in normal children and adults. *Mayo Clinic Proceedings*, 66: 797 – 804
11. Neill WA, Duncan DA, Kloster F & Mahler DJ (1974). Response of coronary circulation to cutaneous cold. *American Journal of Medicine* 56: 471-476
12. Treiber FA, Musante L, Braden D, Arensman F, Strong W, Levy M & Leverett S (1990). Racial differences in hemodynamic responses to the cold face stimulus in children and in adults. *Psychosomatic Medicine* 52: 286–96
13. Heistad DD, Abboud FM & Eckstein JW (1968). Vasoconstrictor response to simulated diving in man. *Journal of Applied Physiology*, 25 (5): 542-49
14. Neumann C & Schmid H (1997). Standardization of a computerized method for calculating autonomic function tests responses in healthy subjects and patients with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 197-205
15. Kennedy WR, Navarro X, Sakuta M, Mandell H, Knox CK & Sutherland DER (1989). Physiological and clinical correlates of cardiorespiratory reflexes in diabetes mellitus. *Diabetes*, 12: 399-408



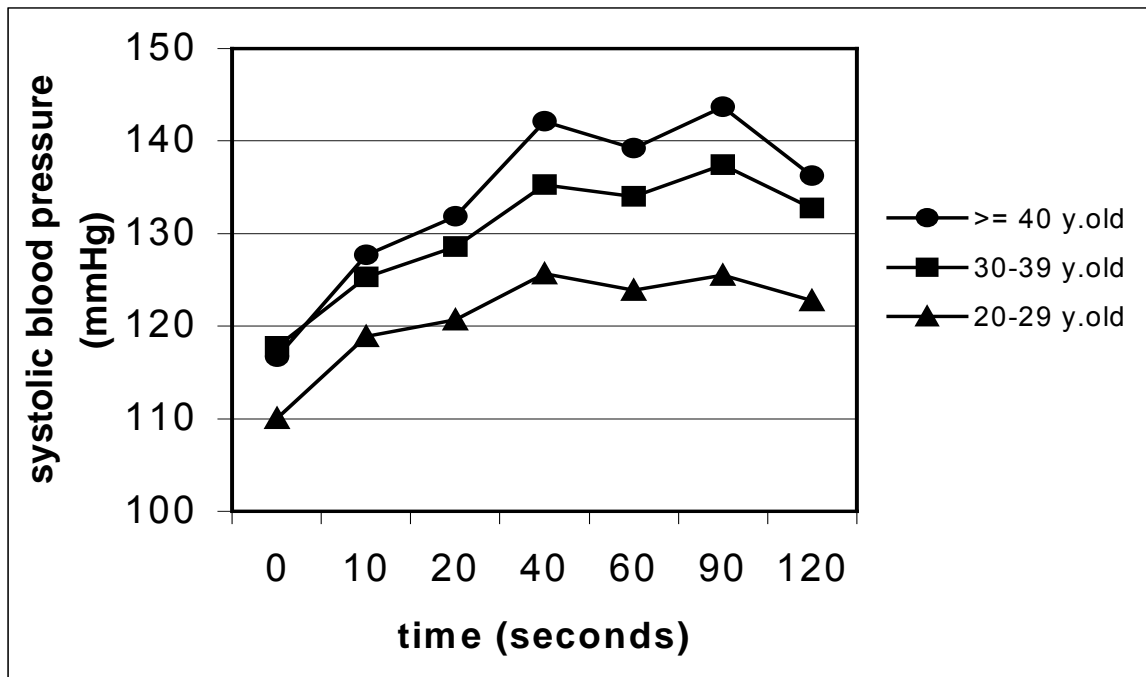
**FIGURE 1** – Percentiles of heart rate (HR) in bpm before (0 second) and during the cold face test



**FIGURE 2** – Heart rates in females and males before (0 seconds) and during the cold face test

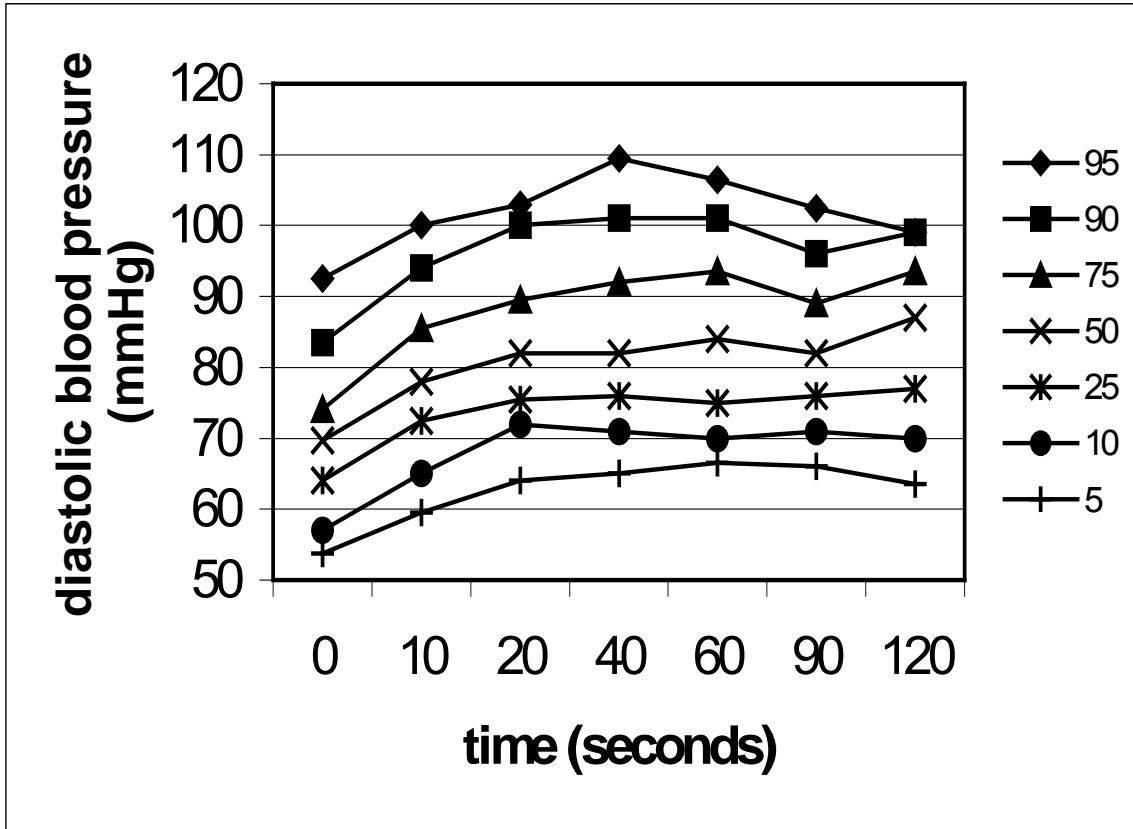


**FIGURE 3** – Percentiles of distribution of systolic blood pressure (SBP) in mmHg before (0 seconds) and during the cold face test



**FIGURE 4** – Systolic blood pressure according to age group before (0 seconds) and during the cold face test





**FIGURE 5** – Percentiles of distribution of diastolic blood pressure (DBP), in mmHg, before (0 seconds) and during the cold face test

## Artigo 1

**Resposta da frequência cardíaca e da pressão arterial de indivíduos normais ao teste do frio na face**

Brugnara L <sup>1</sup>, Chiyoshi C <sup>2</sup>, Neumann C <sup>3</sup>, Miura M <sup>4</sup>, Traiber C <sup>5</sup>, Schmid H <sup>6</sup>

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) / Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA)

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas / Faculdade de Medicina / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) / Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

1. HCPA / ISCMPA / UFRGS
2. UFRGS
3. ISCMPA / UFRGS
4. UFRGS
5. UFRGS
6. HCPA / ISCMPA / UFRGS / FFFCMPA

Fonte de financiamento: CNPq and FAPERGS

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi padronizar respostas ao teste do frio na face, o qual determina uma resposta neurológica autonômica. Em 49 indivíduos aparentemente saudáveis, com 22 a 56 anos, de ambos os sexos (36,7% homens), enquanto em posição supina, foram colocados balões congelados nas regiões malares bilateral e frontal, por 120 segundos e a frequência cardíaca e a pressão arterial foram registradas. Foram observados: bradicardia, máxima entre os 40 e 60 s, elevação da pressão arterial sistólica, máxima entre 40 e 90 s, e elevação da pressão arterial diastólica, máxima aos 20 s. Não houve diferença no comportamento das curvas quanto ao sexo, porém os homens apresentaram frequência cardíaca média mais baixa ( $p = 0,01$ ). Indivíduos com menos de 30 anos de idade responderam com menor aumento de PAS ao teste em relação aos com 40 anos ou mais ( $p = 0,012$ ).

Palavras-chave: teste do frio na face; indivíduos controles; padronização; atividade autonômica

## Introdução

O teste de aplicação de frio na face vem sendo descrito há várias décadas. Foi inicialmente usado para o estudo fisiológico de nadadores e mergulhadores quando imersos em água fria (*diving reflex* – reflexo do mergulho). Posteriormente estudos indicaram que a imersão apenas da face, sem molhar o corpo inteiro, provocava o mesmo efeito fisiológico (1). Khurana e colaboradores (2) identificaram que a aplicação de frio na face, sem mergulhá-la, e com isso sem a interferência da apnéia na avaliação ou o desconforto do mergulho, tinha efeito semelhante. Hoje o teste vem sendo utilizado com o objetivo de propiciar uma resposta neurológica autonômica simpática dos vasos (3).

A elevação das pressões sistólica e diastólica em resposta ao frio tem sido descrita como ocorrendo em animais e humanos, compatível com estímulos simpáticos alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ). Os estímulos nervoso e humoral simpáticos que ocorrem durante o teste determinam vasoconstrição periférica (2, 4) e hipertensão diastólica, compatíveis com estímulo alfa, enquanto a hipertensão sistólica é característica de estímulo beta (4). O teste de imersão da face estimula também uma resposta eferente parassimpática vagal que resulta em bradicardia (2, 5-6). Em alguns estudos, com o objetivo de obter resposta simpática, é realizado o teste do frio aplicado a mão, e este proporciona resposta característica de estímulo simpático apenas (7-9).

Vários estudos vêm descrevendo as respostas do teste do frio na face com diferentes locais de aplicação do frio, temperatura de aplicação e tempos de exposição. Heath e Downey (6) padronizaram o teste do frio na face testando diversas variações e seus respectivos resultados e sugeriram que a aplicação de 0 °C em regiões malares bilateralmente por um período mínimo de 60 segundos seria o mais adequado para obtenção das respostas autonômicas desejadas. Nestes estudos avaliaram a resposta da

a frequência cardíaca e do fluxo sanguíneo, porém não a pressão arterial. Segundo Arnold (10), o teste do frio na face provoca maior variação de frequência cardíaca em indivíduos mais jovens, porém não há diferença de resposta entre os sexos.

Alguns pesquisadores têm apontado a dor causada pelo frio como um dos aspectos responsáveis pela resposta simpática aos testes do frio na face e na mão (7-8). Heath e Downey (6), ao utilizarem diferentes temperaturas e tempos de duração do teste, identificaram que vários indivíduos que se submeteram ao teste consideraram que a temperatura baixa mantida por 120 segundos é desconfortável ou até dolorosa.

No presente estudo, nos propusemos a estudar indivíduos saudáveis, não diabéticos ou hipertensos, e padronizar as respostas de frequência cardíaca e pressões arteriais destes indivíduos ao teste do frio. Esta padronização pode ser útil tanto para avaliação de pacientes nos quais seja necessário um estímulo simpático não-invasivo quanto para uma avaliação da função neurológica autonômica destes pacientes.

## **Material e Métodos**

### **Indivíduos**

Foram recrutados 49 indivíduos hígidos, pais de crianças que consultavam no ambulatório do Hospital de Clínicas e outros voluntários, que sabiam não ser portadores de Diabetes Mellitus por avaliação glicêmica nos últimos 3 meses e sem história familiar de Diabetes Mellitus, não hipertensos, com IMC menor que 25, 18 homens e 31 mulheres, com idades variando entre 20 e 56 anos, brancos.

## Métodos

### *Teste do frio na face*

O frio foi aplicado na face com o objetivo de produzir ativação simpática conforme descrito por Heath e Downey (6). Após repouso em decúbito dorsal por 30 minutos, três balões de borracha cheios de água congelada foram colocados na face (regiões frontal e malar) dos pacientes em estudo por um período de 2 minutos (6, 11). A pressão arterial (PA) foi medida em condições basais e durante o teste, nos tempos -10, 0, 10, 20, 40, 60, 90 e 120 segundos. Para efeito de cálculos, o valor utilizado no tempo 0 foi a média entre os tempos -10 e 0 segundos.

A frequência cardíaca (FC) e o ritmo cardíaco foram avaliados com monitorização cardíaca contínua e a FC registrada nos mesmos tempos acima. Para obtenção mais rápida e precisa dos resultados, o paciente era monitorizado com 2 esfigmomanômetros digitais (braços direito e esquerdo) e os valores eram obtidos de forma alternada (PA em -10 segundos no braço direito, 0 segundos no esquerdo, 10 segundos no braço direito e assim sucessivamente).

Três avaliadores participaram do teste: o primeiro e o segundo controlando e registrando as frequências cardíacas e pressões arteriais (braços direito e esquerdo) e o terceiro acompanhando a monitorização cardíaca contínua e coordenando as tomadas de tempo e valores.

### *Preparação dos indivíduos para o teste de frio na face*

A todos os pacientes foi solicitado não ingerir qualquer medicação nas 48 horas que antecederem aos testes. Instruções foram dadas para suspensão de toda ingestão de cafeína pelo menos por 24 horas antes. Todos os sujeitos foram estudados no período entre 16 e 20 horas do dia. Os sujeitos permaneciam em repouso, em decúbito dorsal,

por 30 minutos antes do início do teste, em uma sala com temperatura estável de 24 a 25 °C.

## Análise Estatística

Padronizamos as respostas dos indivíduos controles como respostas normais, organizando as respostas em curvas de percentis de 5, 10, 25, 50, 75, 90 e 95. Para correlação das máximas diferenças a partir dos pontos iniciais (máximas respostas) e idade, foi utilizada correlação linear de Pearson.

Para comparação entre os valores basais e as respostas obtidas de frequência cardíaca e pressões arteriais sistólica e diastólica, foi realizada análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). Para avaliação da variação das médias de frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica em relação aos basais (variação dos pontos ao longo do tempo), foi utilizada a avaliação intra-sujeitos, teste de Greenhouse – Geisser. Foram considerados como pontos médios das curvas um valor calculado por média aritmética a partir dos resultados obtidos nas 6 respostas ao longo dos 120 segundos (tempos 10, 20, 40, 60, 90 e 120). Para comparação destes pontos médios das curvas foi utilizado o teste “*between subjects*”. Para diferenças no comportamento das curvas (inclinação das curvas) dos grupos foram estudados os componentes de interação entre os sujeitos (teste *within subjects* – Greenhouse – Geisser).

O nível de significância considerado no estudo foi de  $P < 0,05$ .

## Resultados

Foram avaliados 49 indivíduos com idades variando entre 20 e 56 anos (média  $32,8 \pm 10,2$ ), sendo 18 (36,7%) homens e 31 (63,3%) mulheres.

a) Resultados das avaliações das freqüências cardíacas antes e após a exposição da face ao frio:

As freqüências cardíacas basais foram de 70 batimentos por minuto (bpm)  $\pm 9,3$ . Os parâmetros obtidos para a freqüência cardíaca (FC) foram organizados em forma de percentis, apresentados na Figura 1.

Ao longo do teste do frio, houve diferença na variação das respostas da FC ao longo do tempo a partir do basal (ANOVA,  $p = 0,003$ ). A FC apresentou, em relação ao basal, um descenso médio de  $8,5 \pm 8,1$  variando de 0 a  $-32$  batimentos, descenso este que foi máximo entre 40 e 60 segundos do teste, sendo que as respostas correspondentes aos percentis 5 e 95 foi respectivamente 0 e 28 bpm.

Nas análises realizadas para verificar possíveis diferenças quanto ao sexo, não houve diferença entre os comportamentos de respostas das curvas ao longo dos 120 segundos ( $p = 0,18$ ). Houve diferença quando comparados os pontos médios da curva do sexo feminino contra o masculino ( $p = 0,01$ ). As respostas de freqüência cardíaca para o sexo masculino foram mais baixas do que as registradas para mulheres (Figura 2).

Não houve correlação entre a resposta da freqüência cardíaca e idade ( $r = -0,17$ ;  $p < 0,24$  - Pearson). Para as avaliações das respostas da freqüência cardíaca de acordo com diferentes faixas etárias, os indivíduos foram divididos em 3 grupos: de 20 a 29 anos (20 indivíduos), de 30 a 39 anos (15 indivíduos) e com 40 anos ou mais (14 indivíduos). Nas análises realizadas para as faixas etárias propostas, não houve diferença entre os comportamentos de respostas das curvas ao longo dos 120 segundos ( $p = 0,9$ ). Quando



comparados os pontos médios das curvas das diferentes faixas etárias, também não houve diferença significativa ( $p = 0,44$ ).

b) Resultados das avaliações da pressão arterial sistólica antes e após a exposição da face ao frio:

As pressões arteriais sistólicas basais tiveram média de  $114,3 \pm 13,4$  (mmHg). As respostas obtidas para a pressão arterial sistólica (PAS) ao teste do frio estão apresentadas na Figura 3.

Houve diferença na variação das respostas da PAS ao longo do tempo a partir do basal (ANOVA,  $p < 0,001$ ). A PAS mostrou uma resposta máxima entre 40 e 90 segundos do teste com um aumento médio de  $24,8 \pm 13,7$  mmHg em relação ao basal, variando de 6 a 69 mmHg. A resposta correspondente ao percentil 5 e 95 foi um aumento de 6 e 55 mmHg, respectivamente.

Nas análises realizadas para avaliar a possibilidade de diferenças entre os comportamentos de respostas das curvas para indivíduos dos sexos feminino e masculino, não houve diferença ( $p = 0,76$ ) ao longo dos 120 segundos. Quanto à diferença dos pontos médios das curvas nos dois sexos, não foram observadas diferenças ( $p = 0,45$ ).

Houve fraca correlação das máximas respostas de pressão arterial sistólica com a idade ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,000$  - Pearson). Nas análises realizadas para as faixas etárias propostas (20 a 29 anos, de 30 a 39 anos e com 40 anos ou mais), não houve diferença entre os comportamentos de respostas das curvas ao longo dos 120 segundos ( $p = 0,29$ ). Quanto à diferença dos pontos médios das três curvas de faixas etárias, houve diferença significativa ( $p = 0,012$ ). Em uma avaliação par a par com o teste de correção de Bonferroni para os pontos médios das respostas foi observado: menor resposta da PAS de indivíduos entre 20 e 29 anos versus os indivíduos com 40 anos ou mais,  $p = 0,013$ ;

para indivíduos entre 20 e 29 versus indivíduos entre 30 e 39 anos,  $p = 0,13$ ; e para indivíduos de 30 a 39 anos versus indivíduos com 40 anos ou mais,  $p = 1$ . Estes resultados mostram que a diferença das médias das curvas ocorreu em decorrência da diferença entre os indivíduos mais jovens que 30 anos em relação aos com 40 anos ou mais, apresentando os mais jovens respostas das pressões arteriais sistólicas mais baixas (figura 4).

c) Resultados das avaliações da pressão arterial diastólica antes e após a exposição da face ao frio:

As pressões arteriais diastólicas (PAD) basais tiveram média de  $69,6 \pm 9,4$  (mmHg). Os parâmetros obtidos em resposta ao teste do frio, foram organizados em forma de percentis, apresentados na figura 5.

Houve diferença na variação das respostas da PAD ao longo do tempo a partir do basal (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Em relação ao valor basal, houve um incremento máximo a partir de 20 segundos podendo se descrever a curva após este ponto como platô. O aumento médio obtido na PAD foi de  $19,7 \pm 10,1$  mmHg, variando nesta amostra entre 3 e 62 mmHg. Os percentis 5 e 95 das respostas normais foram 6,5 e 39 mmHg, respectivamente.

Nas análises realizadas para os sexos feminino e masculino, não houve, ao longo dos 120 segundos, diferença entre os comportamentos de respostas das curvas ( $p = 0,77$ ). Também não houve diferença quando foram comparados os pontos médios das curvas para os sexos ( $p = 0,12$ ).

Não houve correlação entre a resposta da pressão arterial diastólica e idades ( $r = -0,02$ ;  $p < 0,89$  - Pearson). Na estratificação por idade (de 20 a 29 anos, de 30 a 39 anos e com 40 anos ou mais), não houve diferença entre os comportamentos de respostas das

curvas ao longo dos 120 segundos ( $p = 0,98$ ), assim como quanto aos pontos médios entre as três curvas de faixas etárias ( $p = 0,08$ ).

## **Discussão**

O teste do frio na face vem sendo descrito há várias décadas como um estímulo cardiovascular complexo que resulta em vasoconstricção periférica, diminuição do débito e da frequência cardíaca e manutenção ou discreto aumento da pressão arterial (2, 4-6, 12). Tal teste nos permite realizar uma provocação simpática e vagal simultaneamente, de forma rápida e não invasiva. Ao estudar os 49 indivíduos controles, buscamos definir respostas normais ao teste uma vez que os resultados da literatura são muito variados, ou seja, alguns autores descrevem aumento da pressão arterial (1, 4, 7-9, 12-13) e outros não descrevem este aumento.

Identificamos, assim como Wildenthal (5) e Heath (6), que a frequência cardíaca apresenta um descenso, que foi máximo entre 40 e 60 segundos e que tende a retornar ao basal ao final do teste. Kawakami (1) e Heistad (13) realizaram o teste por um período mais curto (30 segundos) e identificaram bradicardia a partir de 15 e 20 segundos, respectivamente. Finley (4) e Khurana (2), também descrevem bradicardia, sem identificação precisa do momento do descenso. No nosso estudo, identificamos que a frequência cardíaca em homens e mulheres têm o mesmo comportamento, porém em homens é mais baixa que em mulheres (figura 2). Esta diferença ocorrida no ponto médio das curvas de frequência cardíaca entre os sexos também foi descrita por Allen (7). Estratificando os indivíduos por idade, identificamos que não há diferença no comportamento das respostas da frequência cardíaca nem no ponto médio das curvas.

A pressão arterial sistólica apresentou uma resposta máxima entre 40 e 90 segundos. A pressão arterial diastólica mostrou também, em relação ao valor basal, um incremento máximo a partir de 20 segundos descrevendo um platô após este ponto. Estudos de Kawakami (1) e Heistad (13) identificaram incremento das pressões arteriais sistólica e diastólica a partir da metade para o final do teste (teste de 30 segundos). Treiber (12) realizou o teste do frio por 180 segundos e identificou elevação das pressões arteriais sistólica e diastólica nos 80 – 90 segundos com tendência a recuperação nos 180 segundos. No nosso estudo, identificamos que as pressões arteriais sistólica e diastólica em homens e mulheres tiveram o mesmo comportamento e mesmos valores médios. Estratificando os indivíduos por idade, identificamos que não há diferença no comportamento das respostas das pressões arteriais sistólica e diastólica. Os indivíduos mais jovens que 30 anos, porém, têm valores de respostas da pressão arterial sistólica mais baixos que os com 40 anos ou mais (figura 6).

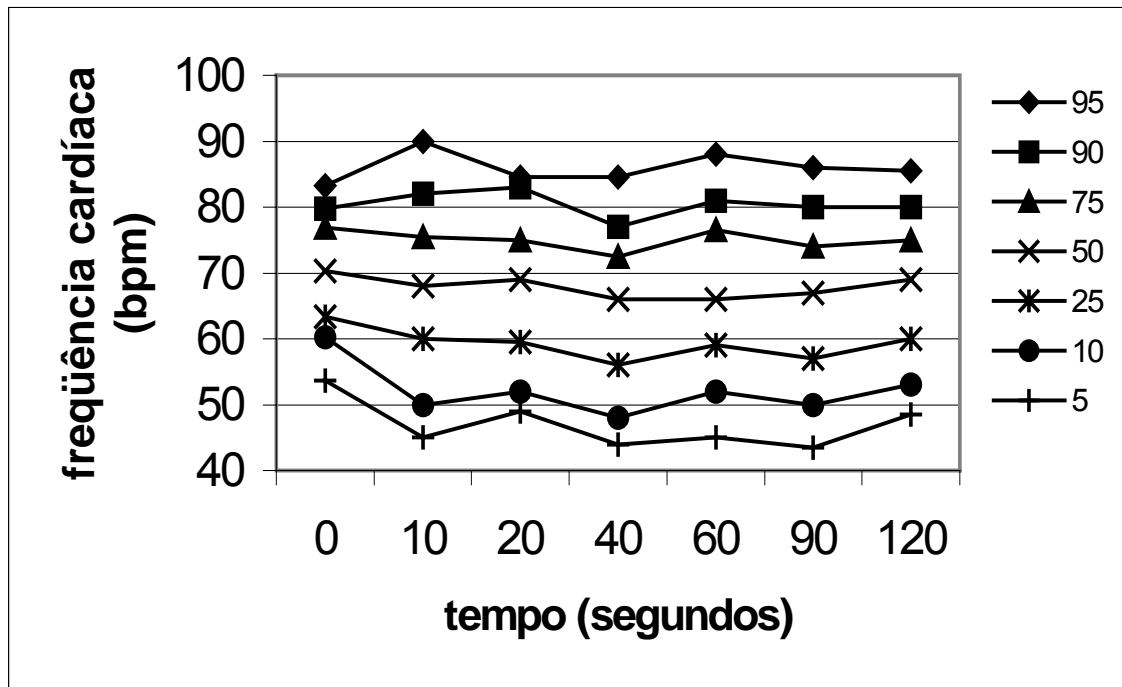
Variações na resposta autonômica têm sido relacionadas com a idade em outros estudos. Neumann e Schmid (14) realizaram uma padronização de resultados de testes autonômicos cardiovasculares e identificaram que, na testagem de frequência cardíaca para respiração profunda, os indivíduos mais jovens que 30 anos apresentavam uma variabilidade maior. Esta manobra testa a função parassimpática, que poderia estar mais preservada em indivíduos mais jovens. Kennedy (15) realizando também testes cardiovasculares de respostas predominantemente parassimpáticas, identificou que indivíduos mais jovens respondem com maior variabilidade.

Considerando que houve resposta autonômica ao teste em indivíduos normais, a frequência cardíaca e a pressão arterial obtidas após frio na face podem mostrar disfunção autonômica quando os resultados obtidos forem diferentes dos observados.

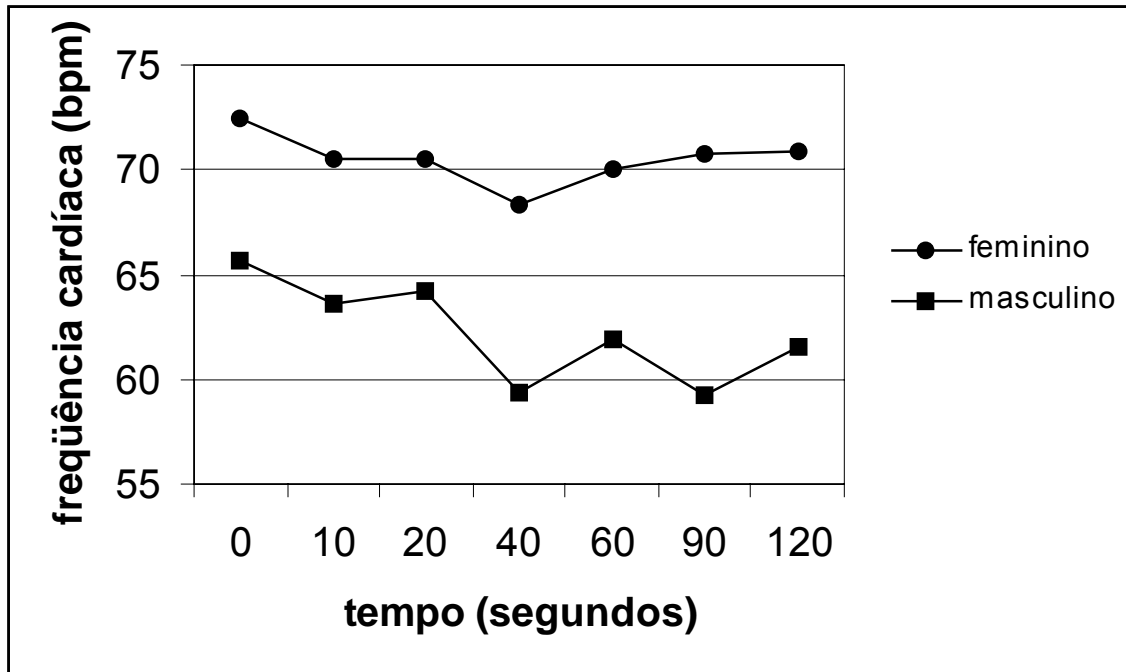
## Referências

1. Kawakami Y, Natelson BH & DuBois AB (1967). Cardiovascular effects of face immersion and factors affecting diving reflex in man. *Journal of Applied Physiology*, 23(6):964-70
2. Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R & Nelson E (1980). Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem-vagal function in humans. *Annals Neurology*, 7: 144-49
3. Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW & Selwyn AP (1988). Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test. *Circulation*, 77 (1): 43-52
4. Finley JP, Bonet JF & Waxman MB (1979). Autonomic pathways responsible for bradycardia on facial immersion. *Journal of Applied Physiology*, 47(6): 1218-22
5. Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM & Skelton CL (1975). The diving reflex used to treat paroxysmal atrial tachycardia. *Lancet* i: 12-14
6. Heath M E & Downey J A (1990). The cold face test (diving reflex) in clinical autonomic assessment: methodological considerations and repeatability of responses. *Clinical Science*, 78: 139-147
7. Allen MT, Shelley KS & Boquet AJ Jr (1992). A comparison of cardiovascular and autonomic adjustments to three types of cold stimulation tasks. *International Journal of Psychophysiology*, 13 (1): 59-69
8. Luft D, Lay A, Benda N, Kort C, Hofmann V, Hardin H & Renn W (1996). Pain intensity and blood pressure reactions during a cold pressor test in IDDM patients. *Diabetes Care*, 19 (7): 722-25

9. Luft D, Maisch C, Hofmann-Krück V, Radjaipour M & Häring HU (2000). Correlates of venous catecholamine concentrations in patients with type 1 diabetes during a cold pressor test. *Clinical Autonomic Research*, 10: 131-37
10. Arnold RW, Dyer JA, Gould AB, Hohenberger GG & Low PA (1991). Sensitivity to vasovagal maneuvers in normal children and adults. *Mayo Clinic Proceedings*, 66: 797–804
11. Neill WA, Duncan DA, Kloster F & Mahler DJ (1974). Response of coronary circulation to cutaneous cold. *American Journal of Medicine* 56: 471-76
12. Treiber FA, Musante L, Braden D, Arensman F, Strong W, Levy M & Leverett S (1990). Racial differences in hemodynamic responses to the cold face stimulus in children and in adults. *Psychosomatic Medicine* 52: 286–96
13. Heistad DD, Abboud FM & Eckstein JW (1968). Vasoconstrictor response to simulated diving in man. *Journal of Applied Physiology*, 25 (5): 542-49
14. Neumann C & Schmid H (1997). Standardization of a computerized method for calculating autonomic function tests responses in healthy subjects and patients with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 197-205
15. Kennedy WR, Navarro X, Sakuta M, Mandell H, Knox CK & Sutherland DER (1989). Physiological and clinical correlates of cardiorespiratory reflexes in diabetes mellitus. *Diabetes*, 12: 399–408

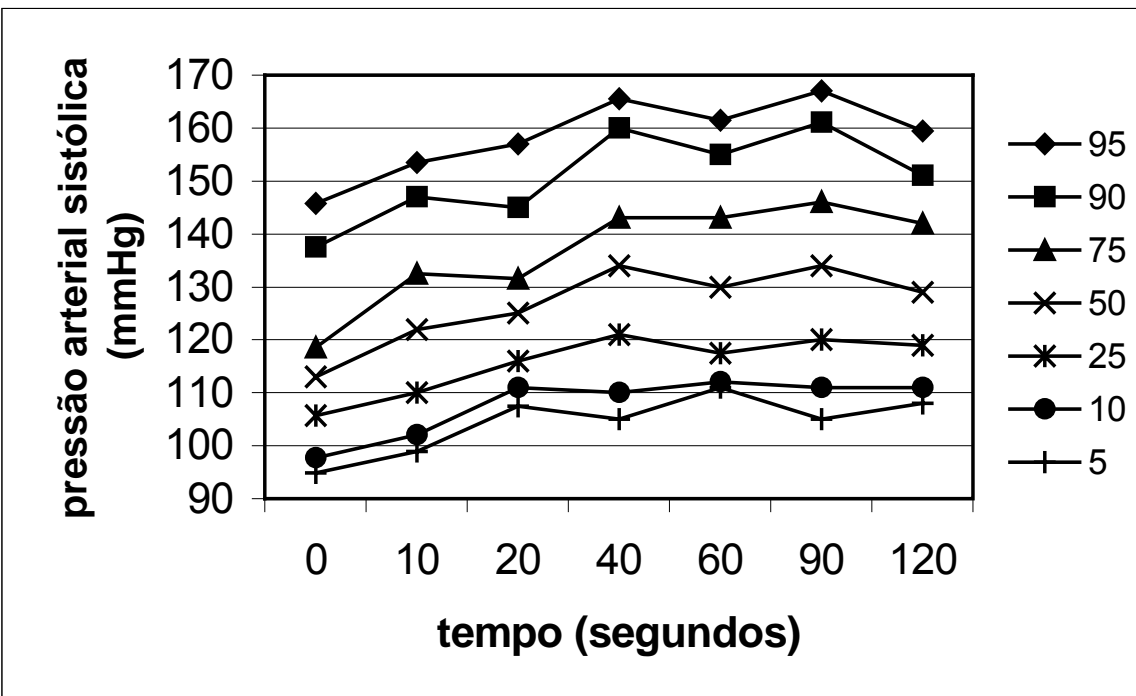


**FIGURA 1** – Percentis de distribuição da frequência cardíaca (FC), antes (0 segundos) e durante a exposição da face ao frio

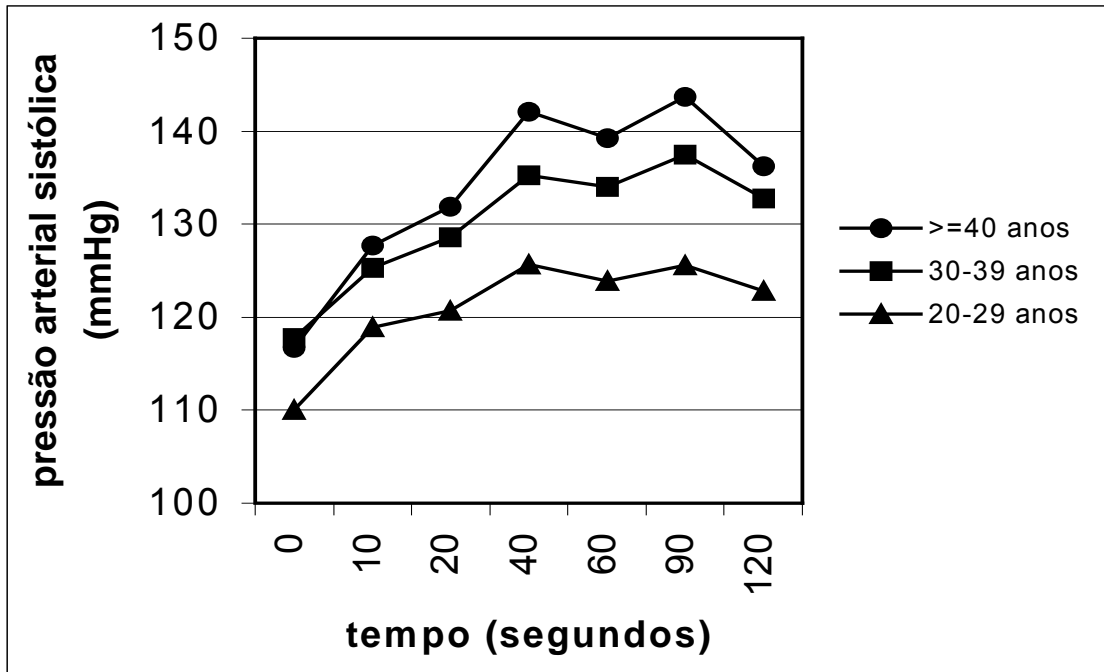


**FIGURA 2** - Frequência cardíaca nos sexos feminino e masculino em resposta ao teste do frio ao longo dos 120 segundos

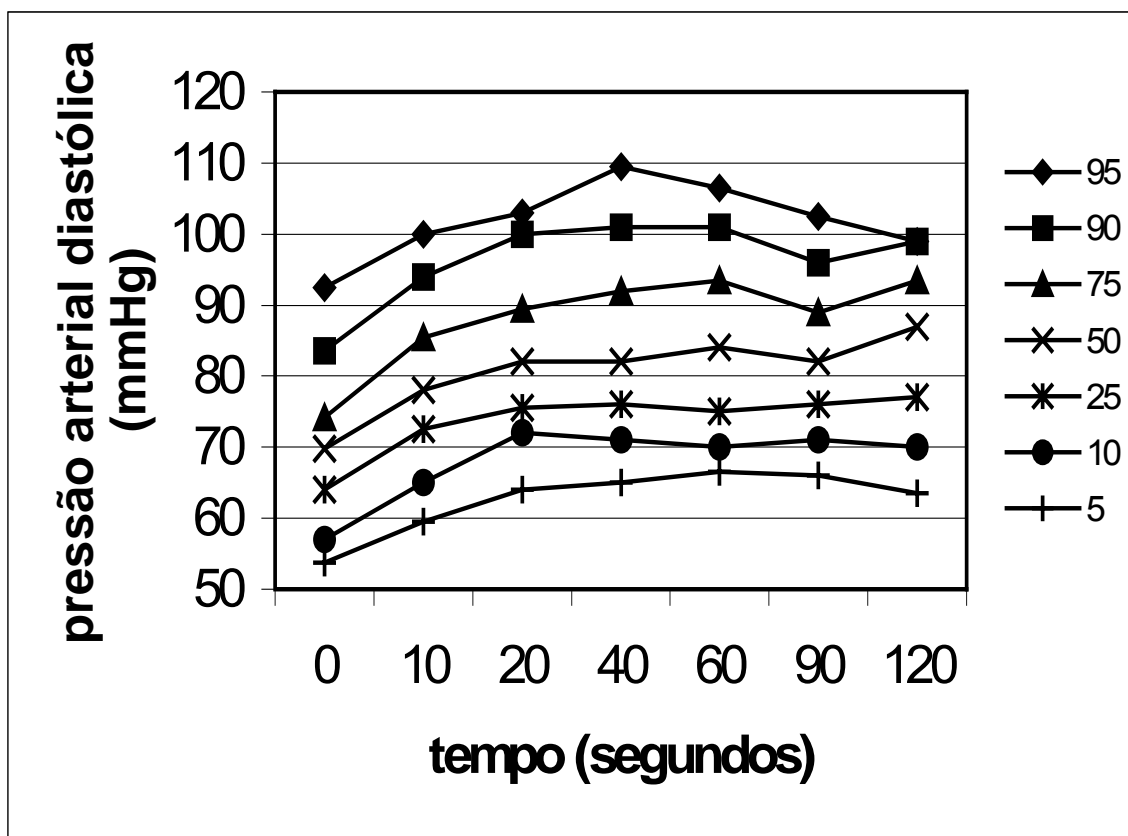




**FIGURA 3** – Percentis de distribuição da pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg, antes (0 segundos) e durante a exposição da face ao frio



**FIGURA 4** – Pressão arterial sistólica de acordo com faixas etárias antes (0 segundos) e durante o teste de exposição da face ao frio



**FIGURA 5** – Percentis de distribuição da pressão arterial diastólica (PAD), em mmHg, antes (0 segundos) e durante a exposição da face ao frio

## Artigo 2

**Blunted decline in the sympathetic response to the cold face test in patients with Diabetes Mellitus without autonomic dysfunction**

Brugnara L <sup>1</sup>, Chiyoshi C <sup>2</sup>, Neumann C <sup>3</sup>, Waldemar F <sup>4</sup>, Klein G <sup>5</sup>, Schmid H <sup>6</sup>

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) / Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA)

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas / Faculdade de Medicina / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) / Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

1. HCPA / ISCMPA / UFRGS

2. UFRGS

3. ISCMPA / UFRGS

4. UFRGS

5. UFRGS

6. HCPA / ISCMPA / UFRGS / FFFCMPA

Research supported by CNPq and FAPERGS

## Abstract

The present study was motivated by the search for a test to stimulate the cardiac sympathetic nervous system of diabetic patients with and without microangiopathy and control individuals. Since the face is usually the last area where deinnervation takes place in Diabetes, we choose to conduct the cold face test as a sympathetic stimulus. Ice bags were applied to both sides of the frontal and malar regions of 15 subjects with Diabetes and microangiopathy, 17 subjects with Diabetes without microangiopathy and 49 control subjects, who stayed in supine position, for 120 seconds. Heart rate and blood pressure were determined at – 10, 0, 10, 20, 40, 60, 90 and 120 s. Before starting the test, the mean value for the systolic blood pressure of microangiopathic subjects was 17.3% higher than the mean value of the control group ( $p < 0.005$ ) and 8.4% higher than the mean value of non-microangiopathic individuals ( $p < 0.003$ ). All the three groups responded to the cold face test with bradycardia and increased systolic and diastolic blood pressure. Diabetic patients (both groups) presented a non-descent slope in the systolic blood pressure during the last phase of the stimulus, differently from the control subjects (without microangiopathy,  $p = 0.004$ ; with microangiopathy,  $p = 0.001$ ), suggesting that in Diabetic subjects without autonomic neuropathy described by Ewing a sympathetic hyperactivity might be present.

Key words: cold face test; control subjects; diabetes mellitus; autonomic activity

## Introduction

The cold face test has been used to assess the organism responses to a sympathetic stimulus. In patients with Diabetes Mellitus, we think that the site where cold should be applied in order to obtain a sympathetic stimulus is the face, since as showed by Low et al (1), that area of the skin is usually the last one that denervates as an effect of the Diabetic Polineuropathy.

A stimulus for the endothelial function, similar to that obtained when the face is submitted to a cold test was described when acetylcholine is directly applied into coronary arteries (2-3). In response to that test, it has been noticed that patients with Diabetes Mellitus often present with a paradoxal vasoconstriction response (3), which usually precedes the finding of atheromas.

Moreover, the cold stimulus applied to the face of patients with Diabetes Mellitus can be useful for producing a sympathetic stimulus through a non-invasive procedure and to assess responses to it. In order to cause that stimulus, the integrity of the sympathetic innervation from the face down to the cardiac area is necessary when responses of both heart rate and blood pressure are assessed. Although the normal response of heart rate and blood pressure to the cold face stimulus has already been described in some studies (4-9), little is known about the responses to that stimulus among patients with Diabetes with and without chronic complications.

In a previous study, we evaluated forty-nine apparently healthy individuals (18 males, 36.7%), 22 – 56 years of age. In supine position, they had ice bags applied to their frontal and malar regions for 120 s, and their heart rate and blood pressure were measured. Bradycardia (maximum between 40 and 60 s), increased systolic blood pressure (maximum between 40 and 90 s), and increased diastolic blood pressure

(maximum at 20 seconds) were observed. There was no difference in the slope of the curves related to gender, but males presented with a lower mean heart rate. Individuals younger than 30 years old responded with less increased SBP in comparison to individuals with 40 or older.

Cardiac arrhythmia associated to autonomic neuropathy of Diabetes has caused significant mortality rates in those patients. The present study was motivated by the search of a test to stimulate the cardiac sympathetic nervous system and consequently the coronary endothelium function of patients with Diabetes. Both, high morbidity and mortality associated to the diabetic cardiac ischemic disease and polineuropathy, which resulted in cardiac arrhythmias, have encouraged us to search for a better understanding, assessment and follow-up of this problem.

## **Patients and Methods**

### **Patients**

Thirty-two diabetic patients were selected among the ones who were attending the Diabetes Mellitus outpatient service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, as participants who were eligible for being included in this study. Eighteen Type 1 and 14 Type 2 diabetic patients, 20 – 60 years of age, were included (all of them were normotensives, with systolic blood pressure lower than 140 mmHg, and diastolic blood pressure lower than 90 mmHg). They did not present the exclusion criteria for participate in the study, which were being hipertensive, alcoholic, drug addict, smoker, pregnant woman, vasoactive and immunosuppressor drug user, as well as be a subject suffering from hypothyroidism or hyperthyroidism, kidney failure, hypoxemic disease or ischemic cardiopathy. Ischemic cardiopathy was identified through ergometric ECG positive testing and/or positive myocardial scintigraphy with dipyridamol. First, the

patients were submitted to the ergometric ECG. If the results were not conclusive or the patients weren't physically able for the test, they went through scintigraphy tests. Patients that reported episodes of hypoglycemia until 48 hours before the cold face test and the autonomic function assessment tests were also not included in this study.

Of the patients who were selected, there were 19 males and 13 females; all of them were white. Fasting glycemia, glycosylated hemoglobin, creatinine, potassium, urea, plasmatic lipids (total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides), routine urinalysis, uroculture and microalbuminuria in 24-hour urine were performed in order to assess the metabolic control and the possibility of other chronic complications due to Diabetes. The TSH test was carried out to exclude thyroid functional alterations, particularly hypothyroidism. Anamnesis and physical examination, as well as an initial routine ECG were recorded.

The patients were also assessed as to their autonomic responses through tests as described by Ewing (10) and standardized in our laboratory (11). An informed consent was obtained from all the patients. The Ethical Committee of both hospitals approved the study.

The diabetic patients were submitted to the cold face test (as described below) and divided into two groups for analysis: 1) with microvasculature disease: alteration in funduscopy and/or positive microalbuminuria, and 2) without microvascular disease.

## Controls

In order to carry out the cold face test, 49 healthy people (18 men, 31 women) were recruited among the parents of pediatric outpatients attending the hospital and other volunteers who knew that they did not suffer from Diabetes Mellitus through glycemic evaluation in the last three months, and with no family history of Diabetes Mellitus. These individuals were non-hypertensive, with Body Mass Index lower than 25, and ages ranging from 20 to 56.



### Characterization of the microangiopathic disease

We used as clinical indicators of microangiopathic disease the presence of micro or macroalbuminuria in 24-hour urine and/or presence of diabetic retinopathy (12-13) in tests carried out in the preceding six months before the cold face test. Patients whose 24-hour microalbuminuria results were lower than 30 mg were found to be normoalbuminuric; those with 30 – 300 mg results were considered as microalbuminuric; and the ones whose results were higher than 300 mg were considered as macroalbuminuric. Uroculture and urinalysis were assessed in the same collections so as to exclude the possibility of concomitant urinary tract infection, which would affect the results. The abnormal results were confirmed through new collections of 24-urine. Fundoscopy was conducted 10 minutes after pupillary dilation with 0.5% tropicamide collyrium applied by an ophthalmologist. The presence of retinopathy was diagnosed when there were microaneurysms and punctuate hemorrhage, whether or not associated with hard or cotton exudates. Whenever the presence of neovascularization was observed or when there were signs of pan-photocoagulation in retina, retinopathy was classified as proliferative.

### Characterization of autonomic neuropathy

Abnormalities of the autonomic function were defined through the use of cardiovascular tests proposed by Ewing (10) and standardized by Neumann (11). Subjects with 0 or 1 abnormal test were considered as persons without autonomic neuropathy; patients with 2 – 3 abnormal tests were seen as patients with moderate neuropathy; and those with 4 abnormal tests were considered as having severe neuropathy.

## Laboratory measurements

The measurements were conducted in the routine laboratories of Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Laboratories of Biochemistry and Radioimmunoassay. Blood samples for biochemical analysis were obtained after a 12-hour night fast. Both blood and urine samples were collected near the cold face test day. The samples were used for determining fasting glycemia (Glico-DH method), HbA1c (HPLC Hitachi L-9100®), creatinine (Jaffé without protein precipitation), potassium (indirect potentiometry [ISE]), urea (UV GHID 2 [Mega Bayer®]), total cholesterol (CHOD-PAP), HDL cholesterol (direct method by selective inhibition [Mega Bayer®]), triglycerides (GOD-PAP method [Mega Bayer®]), TSH (chemiluminescence [Imulite®]), microalbuminuria (immunoturbidimetry – microalbi [Bayer®]), routine urinalysis and uroculture.

## Cold face test

Cold was applied to the face to produce sympathetic activation as described by Heath and Downey (8). After resting in supine position for 30 minutes, the subjects had their faces covered with three ice water rubber bags (frontal and malar regions) for a 2-minute period (8, 14). Blood pressure was measured in baseline conditions and during the test at – 10, 0, 10, 20, 40, 60, 90 and 120 s. For statistics, time 0 was the mean of time – 10 seconds and time 0 seconds.

The heart rate (HR) and cardiac rhythm were assessed through continuous cardiac monitoring, and HR was recorded at the same times indicated above. In order to obtain the results more rapidly and accurately, the subjects were monitored with 2 digital sphygmomanometers (both right and left arms), and values were alternately obtained (Blood pressure at – 10 s in the right arm, at 0 s in the left arm, at 10 s in the right arm, and so on).

Three technicians participated in the test: the first and the second technicians were controlling and recording heart rate and blood pressure (in both arms) while the third technician was following the continuous cardiac monitoring and coordinating time and blood pressure measures.

All patients were asked not to take any medication but for glycemic control during 48 hours prior to the test. They were given instructions to suspend any ingestion of caffeine at least 24 hours before the test. The autonomic neuropathy test and the cold face test were carried out in two different afternoons. All subjects were studied between 4 pm and 8 pm. The patients rested in supine position for 30 minutes before the test in a temperature controlled room ( $24^{\circ} - 25^{\circ} \text{C}$ ).

#### Statistical analysis

For comparisons between groups (Diabetes Mellitus without microangiopathy, with both Diabetes Mellitus and microangiopathy, and controls) as to categorical variables such as gender and type of diabetes, the chi-square test was used. For comparisons between groups as to their quantitative metabolic states, the t test, by Student, was employed (body mass index [BMI], total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, creatinine, glycated hemoglobin [HbA1c] and glycemia, age).

The comparisons of baseline values and heart rate, and systolic and diastolic pressure of the three groups (diabetics without microangiopathy, diabetics with microangiopathy and controls) were made by using analysis of variance (two ways-ANOVA) with repeated measures. In order to evaluate variation of the means of heart rate and systolic and diastolic blood pressure to the baseline values (variation of points throughout time), the evaluation between subjects the evaluation between subjects, Greenhouse – Geisser test, was used. Values estimated by arithmetical mean based on the results obtained in all of the six responses over 120 s (10, 20, 40, 60, 90 and 120s)

were considered as mean points of the curves. The between-subjects test was used to compare mean points. Components of interaction within subjects (within-subjects test, Greenhouse – Geisser) were studied to evaluate differences among the curves slope.

The analyses of heart rate and blood pressure were corrected according to age by using age as a covariable of ANOVA (ANCOVA).

The significance level considered in this study was  $P < 0.05$ .

## Results

### a) General characteristics of the assessed subjects:

Subjects were allocated in one of the three groups of the study: diabetic patients without microangiopathy (17 subjects), diabetic patients with microangiopathy (15 subjects) and apparently healthy individuals (49 controls). An attempt for equaling them according to age was done.

The general characteristics of the groups studied, as well as the metabolic control of diabetics are shown in Table I.

It was observed that the metabolic control was not different among groups for the following variables: total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, fasting glycemia, glycosylated hemoglobin and creatinine. All the patients had normal levels of TSH. There were no differences among the distribution of the results of these variables of Type 1 and Type 2 diabetic patients for the groups of diabetic patients with and without microangiopathy.

Among diabetics, patients with microangiopathic disease were older ( $p = 0.013$ ) and had suffered from Diabetes for a longer period in comparison to the group without microvascular disease ( $p = 0.033$ ), which is consistent with the disease evolution.

According to their age, the control group was similar to the group of diabetics without microangiopathy.

Tests of autonomic neuropathy were carried out as described, and only three patients had an abnormal result for the cardiovascular test.

b) Assessment of heart rate before and during facial cooling

b.1) Baseline

Among diabetic individuals, heart rate for baseline ( $76.2 \text{ bpm} \pm 13.3$ ) was 8% higher ( $p < 0.027$ ) than among controls ( $70.5 \pm 9.7$ ). The diabetics with microangiopathy had a mean heart rate of  $74 \pm 12.4$ , and in the group of diabetics without microangiopathy heart rate was  $77 \pm 13.9$  ( $p = 1$ ). There was no difference in baseline heart rate either between controls and diabetics without microangiopathy ( $p = 0.08$ ) or between controls and diabetics with microangiopathy ( $p = 0.64$ ).

b.2) Response of heart rate to facial cooling

The results obtained for heart rate measures of the three groups analyzed in this study (diabetics without microangiopathy, diabetics with microangiopathy and controls) are shown in Table II and Figure 1. There was no significant difference in the variation of points along when compared to the starting points ( $p = 0,17$ ). There was also no difference between mean points of the curves of diabetics with and without microangiopathy and controls ( $p = 0.092$ ). No difference was observed in the slope of the curves of the groups studied ( $p = 0.83$ ).

c) Systolic blood pressure (SBP) assessment before and during facial cooling

c.1) Baseline

Baseline systolic blood pressure of diabetic individuals was 10.3% higher ( $124.2 \text{ mmHg} \pm 12.9$ ) than SBP of controls ( $112.6 \pm 12.6$ ,  $p < 0.05$ ). Systolic blood pressure of diabetics with microangiopathy ( $132 \pm 11.5$ ) was 8.4% higher than among diabetics without microangiopathy ( $121.7 \pm 12.6$ ,  $p = 0.03$ ). Diabetics without microangiopathy presented baseline SBP that was similar to controls ( $p = 1$ ), and those with microangiopathy presented SBP 17.3% higher than controls ( $p = 0.005$ ).

#### c.2) Response of SBP to facial cooling

The results obtained for measures of systolic and diastolic blood pressure for the cold face test are presented in Table III and Figure 2. In the analysis that assessed systolic pressure variations (ANOVA), there was a tendency towards variation of the points along the time from their starting points ( $p = 0.072$ ), difference among mean points of curves of controls, diabetics with and without microangiopathy ( $p = 0.004$ ) and difference in the slopes of the responses in the curves over the 120 s ( $p = 0.001$ ).

With a more detailed analysis for that different behavior of the curves of systolic pressure, we compared the groups in pairs (ANOVA for repeated measures). We obtained the following results: difference of slope of the curve of diabetics without microangiopathy in relation to control individuals ( $p = 0.004$ ), difference of the slope of the curve of diabetics with microangiopathy in relation to controls ( $p = 0.001$ ) and similar values for diabetics with and without microangiopathy ( $p = 0.46$ ).

#### d) Assessment of diastolic blood pressure (DBP) before and during facial cooling

##### d.1) Baseline

In diabetic individuals, baseline diastolic blood pressure was 13% higher ( $78.2 \text{ mmHg} \pm 7.4$ ) than controls ( $69.2 \pm 9.5$ ,  $p < 0.001$ ). There was no difference in baseline diastolic blood pressure between diabetics with microangiopathy ( $80 \pm 6.8$ ) and diabetics

without microangiopathy ( $75.6 \pm 8$ ,  $p = 0.47$ ). Diabetics with microangiopathy presented with baseline DBP 15.6% higher than controls ( $p < 0.001$ ). Diabetics without microangiopathy tended to present baseline DBP 9.2% higher than controls ( $p = 0.051$ ).

#### d.2) DBP response to facial cooling

The results obtained for measures of diastolic blood pressure with the cold face test are shown in Table III and Figure 3. There was a difference in points throughout time of the curves of diastolic blood pressure from their starting points ( $p < 0.001$ ). There was no difference between mean points of the curves of diabetics without and with microangiopathy and controls ( $p = 0.17$ ); no difference in the responses behavior of the curves over 120 s of the groups studied ( $p = 0.09$ ) was found.

Resuming, the baseline points of the curves of heart rate as well as systolic and diastolic blood pressure were higher among diabetics in comparison to controls. Diabetes caused alterations in heart rate as well as in systolic and diastolic blood pressure along 120 s of cold face test, which was significantly different just for the last two parameters. The curves of heart rate did not have different slopes among groups, neither did diastolic blood pressure. The behavior (slope) of the curve of systolic blood pressure of Diabetic patients with and without microangiopathy was different from controls: there was a non-descent, or an attenuated final descent of the curve.

## Discussion

The present study assessed individuals with Diabetes Mellitus who were compared to apparently healthy controls. The group of diabetic patients presented higher heart rate, suggesting the possibility of the presence of incipient, mild disautonomy, since the responses to cardiovascular tests were slightly compromised in only three diabetic patients.

The cold face test is a test of sympathetic and parasympathetic stimulus that presents well-known responses in normal individuals, which have already been described by several authors (6-8, 15-16) and by our team. In this study, we selected diabetic patients without evidence of autonomic neuropathy as identified through the traditional tests described by Ewing (10). Our main purpose was to carry out the cold face test for defining its performance as a sympathetic stimulus. There were some differences in the responses of diabetic patients in comparison to control individuals.

We initially found that the diabetic patients with and without microangiopathy responded to the cold face test by showing increased systolic and diastolic blood pressure and decreased heart rate, just like control individuals. The results showed that the individuals tested had enough sympathetic and parasympathetic innervation to be stimulated. This fact is in accordance with studies that have characterized the body autonomic innervation through tests of sudomotor function (1). Furthermore, the curve of systolic blood pressure of diabetic patients was different from the curve of controls: there was a non-descent or an attenuation of the final descent of the curve. If we extrapolate it to the occurrence of night non-descent of blood pressure, this finding might be reflecting a sympathetic hyperactivity. Some studies have shown an association between sympathetic hyperactivity and microvasculature alterations of Diabetes (17-18). Lindmark (19) has



suggested that there is an attenuation of the parasympathetic activity in non-diabetic first-degree relatives of patients with Type 2 Diabetes, which points to the association between sympathetic hyperactivity and resistance to insulin.

The sympathetic hyperactivity correlates with the endothelium hyperactivity and hyper reactivity. The normal circulatory response to a sympathetic stimulus is vasodilatation with increased myocardial blood flow (20). Nitenberg (3) infused acetylcholine in diabetic patients and in control individuals, which revealed that diabetics had coronary vasoconstriction, whereas the controls had vasodilatation. With a sympathetic stimulus as we have described, similar findings are likely to be obtained in relation to vasoconstriction and vasodilation.

Thus the findings of this study show that the cold face stimulus may be useful to produce sympathetic response and probably coronaray vasoconstriction when it is carried out in patients with endothelial coronary dysfunction. On the other hand, heart rate and blood pressure responses to the cold face stimulus might show autonomic dennervation if the test were applied to persons with parasympathetic or sympathetic defects in other tests. Others studies should define better this possibility.

## References

1. Low PA & Fealey RD (1999). Sudomotor Neuropathy In: Peter J Dick & PK Thomas *Diabetic Neuropathy – 2<sup>nd</sup> ed*, Saunders Company, USA
2. Horio Y, Yasue H, Rokutanda M, Nakamura N, Ogawa H, Takaoka K, Matsuyama K & Kimura T (1986). Effects of intracoronary injection of acetylcholine on coronary arterial diameter. *American Journal Cardiology*, 57: 984-89
3. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E & Attali J-R (1993). Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilatation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes*, 42: 1017-25
4. Kawakami Y, Natelson BH & DuBois AB (1967). Cardiovascular effects of face immersion and factors affecting diving reflex in man. *Journal of Applied Physiology*, 23(6):964-70
5. Heistad DD, Abboud FM & Eckstein JW (1968). Vasoconstrictor response to simulated diving in man. *Journal of Applied Physiology*, 25 (5): 542-49
6. Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R & Nelson E (1980). Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem-vagal function in humans. *Annals of Neurology*, 7: 144-49
7. Finley JP, Bonet JF & Waxman MB (1979). Autonomic pathways responsible for bradycardia on facial immersion. *Journal of Applied Physiology*, 47(6): 1218-22
8. Heath M E & Downey J A (1990). The cold face test (diving reflex) in clinical autonomic assessment: methodological considerations and repeatability of responses. *Clinical Science*, 78: 139-147

9. Allen MT, Shelley KS & Boquet AJ Jr (1992). A comparison of cardiovascular and autonomic adjustments to three types of cold stimulation tasks. *International Journal of Psychophysiology*, 13 (1): 59-69
10. Ewing DJ & Clarke BF (1982). Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *British Medical Journal*, 285: 916-18
11. Neumann C & Schmid H (1997). Standardization of a computerized method for calculating autonomic function tests responses in healthy subjects and patients with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 197-205
12. Clark CM & Lee DA (1995). Prevention and Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*; 332:1210-17
13. Ferris FL, Davis MD & Aiello LM (1999). Treatment of Diabetic Retinopathy. *New England Journal of Medicine*; 341: 667-78
14. Neill WA, Duncan DA, Kloster F & Mahler DJ (1974). Response of coronary circulation to cutaneous cold. *American Journal of Medicine*, 56: 471-76
15. Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM & Skelton CL (1975). The diving reflex used to treat paroxysmal atrial tachycardia. *Lancet* i: 12-14
16. Treiber FA, Musante L, Braden D, Arensman F, Strong W, Levy M & Leverett S (1990). Racial differences in hemodynamic responses to the cold face stimulus in children and in adults. *Psychosomatic Medicine* 52: 286-96
17. Pecis M, Azevedo MJ, Moraes RS, Ferlin EL & Gross JL (2000). Autonomic dysfunction and urinary albumin excretion rate are associated with an abnormal blood pressure pattern in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 23(7): 989-93
18. Vörös P, Lengyel Z, Nagy V, Németh C, Rosivall L & Kammerer L (1998). Diurnal blood pressure variation and albuminuria in normotensive patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13: 2257-60

19. Lindmark S, Wiklund U, Bjerle P & Eriksson JW (2003). Does the autonomic nervous system play a role in the development of insulin resistance? A study on the heart rate variability in first-degree relatives of type 2 diabetes patients and control subjects. *Diabetic Medicine*, 20: 399-405
20. Grambow D, Dayanikli F, Muzik O, Sutor R, Rubenfire M, Werns S & Schwaiger M (1993). Assessment of endothelial function with PET cold pressor test in patients with various degrees of coronary atherosclerosis. *Journal Nuclear Medicine*, 34: A137

TABLE I – GENERAL CHARACTERISTICS

	Controls	DM without microangiopathy	DM with microangiopathy	P
no. Subjects	49	17	15	-
Age (years old)*	32,8 ± 10,2	36,5 ± 13,1	47,0 ± 8,2	0,013 ‡
Gender (% males)	36,7	52,9	66,6	0,09
DM duration (years)*	-	6,8 ± 4,3	13,6 ± 8,7	0,033 ‡
DM type (% DM2)	-	41,1	46,6	0,33
BMI (kg/m2)*	-	25,1 ± 3,0	24,0 ± 2,1	0,38
Glycemia (mg/dl)*	-	174,4 ± 90,6	178,5 ± 129,3	0,86
HbA1c (%)*	-	6,28 ± 1,3	6,4 ± 1,3	0,97
Total cholesterol (mg/dl)*	-	187,5 ± 40,1	187,7 ± 36,6	0,93
HDL cholesterol (mg/dl)*	-	46,6 ± 10,5	47,1 ± 17,8	0,99
LDL cholesterol (mg/dl)*	-	116,2 ± 26,7	120,6 ± 32,2	0,66
Triglycerides (mg/dl)*	-	116,1 ± 85,6	98,6 ± 47,1	0,65
Creatinine (mg/dl)*	-	0,72 ± 0,10	0,84 ± 0,17	0.1
ANT (1 altered test) – no. Patients **	-	1	2	
Fundoscopy (retinopathy)	-	Normal	Non-proliferative – 92,8% (13 patients) Proliferative – 7,25% (1 patient)	†
AUE (> 30 mcg/L)**	-	Negative	Microalbuminuria – 80% (4patients) Macroalbuminuria – 20% (1patient)	†

\* mean ± standard deviation

\*\* ANT – autonomic neuropathy test

AUE - Albumin urinary excretion

‡ statistically different between DM with and without microangiopathy

† Different

TABLE II – Variation of heart rate during the cold face test in controls, diabetics without microangiopathy and diabetics with microangiopathy – means, confidence intervals (CI) and comparison between groups.

Time (seconds)	Controls Mean HR (bpm) and CI* (95%)	DM without microangiopathy Mean HR (bpm) and CI* (95%)	DM with microangiopathy Mean HR (bpm) and CI* (95%)
0	69,9 (66,8 – 73,1)	76,9 (71,6 – 82,3)	74 (68,3 - 79,7)
10	68 (64,4 – 71,6)	74,5 (68,4 - 80,6)	73 (66,5 - 79,4)
20	68,1 (64,6 – 71,7)	74,9 (68,8 – 81)	72,4 (65,9 - 78,8 )
40	65 (61,1 – 68,8)	72,8 (66,2 - 79,3)	73,5 (66,5 - 80,4)
60	67 (63,2 – 70,8)	75 (68,5 - 81,5)	74,6 (67,7 - 81,4)
90	66,5 (62,7 - 70,3)	74,4 (68 - 80,9)	74,8 (67,9 - 81,6)
120	67,4 (63,8 - 70,9)	72,9 (66,9 - 78,9)	74 (67,6 - 80,3)

TABLE III – Variation of systolic and diastolic blood pressure (SBP / DBP) during the cold face test in Controls, Diabetics without microangiopathy and Diabetics with microangiopathy – means, confidence intervals (CI) – and comparison among groups.

Time (seconds)	BP (mmHg)	Controls	DM without microangiopathy	DM with microangiopathy
		Mean and CI (95%)	Mean and CI (95%)	Mean and CI (95%)
0	PAS	114,3 (110,6 -117,9)	122 (115,9 – 128)	132 (125,4 - 138,6)
	PAD	69,6 (67,1 - 72,1)	75,6 (71,3 - 79,8)	80 (75,5 - 84,5)
10	PAS	123,3 (119,2 -127,5)	127 (120,1 - 133,8)	136 (128,6 - 143,5)
	PAD	79,2 (76,4 – 82)	82 (77,3 - 86,6)	86,3 (81,3 - 91,3)
20	PAS	126,2 (122,3 – 130,2)	134,2 (127,8 - 140,7)	146,6 (139,5 - 153,6)
	PAD	83,5 (80,6 - 86,5)	85,2 (80,2 - 90,2)	88,5 (83,2 - 93,8)
40	PAS	133,4 (128,7 – 138)	139,7 (132 - 147,4)	149,2 (140,8 - 157,7)
	PAD	83,9 (80,7 - 87)	90,6 (85,2 – 96)	93,7 (88 - 99,4)
60	PAS	131,3 (126,7 -135,9)	145,7 (138,1 - 153,3)	161,4 (153,1 - 169,7)
	PAD	84,4 (81 - 87,9)	93 (87,2 - 98,9)	93,6 (87,4 - 99,8)
90	PAS	134,3 (129,5 - 139,2)	142,7 (134,7 - 150,6)	155,1 (146,4 - 163,8)
	PAD	82,7 (79,8 - 85,6)	88,5 (83,6 - 93,5)	93,6 (88,3 - 98,8)
120	PAS	129,6 (125,1 - 134,2)	146,9 (139,4 - 154,4)	162,8 (154,6 – 171)
	PAD	84 (80,9 - 87,1)	87,5 (82,3 - 92,8)	91,1 (85,5 - 96,7)

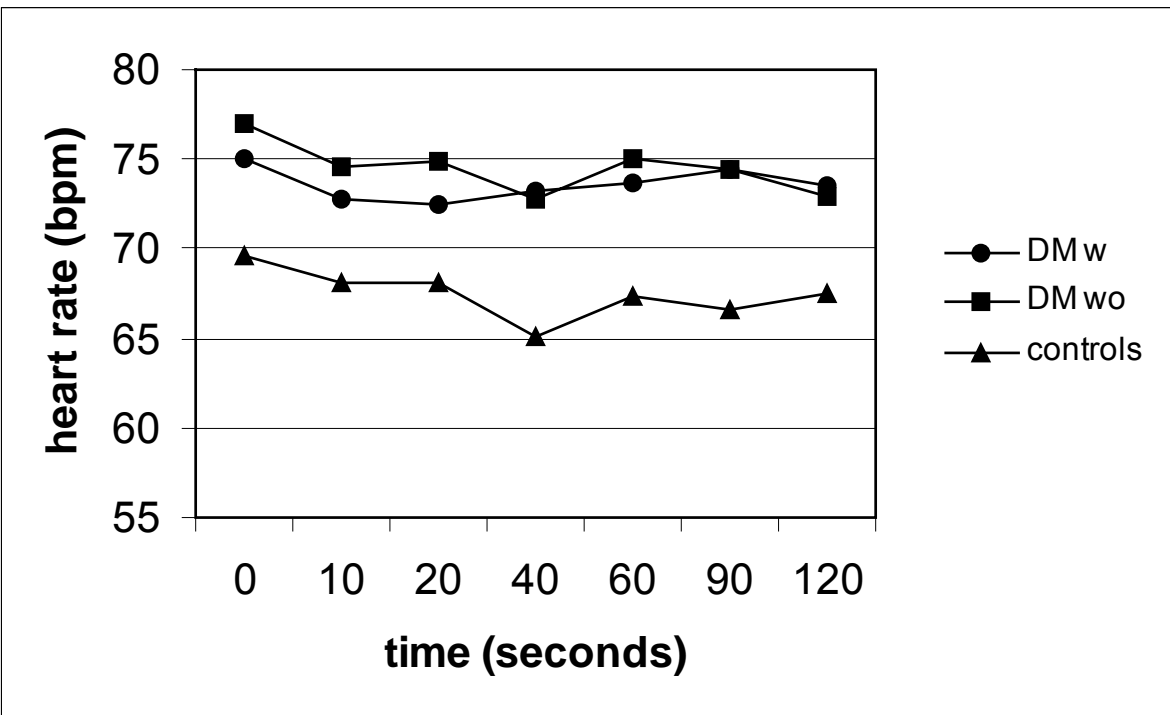


FIGURE 1 – Heart rate values for the cold face test over 120 s in groups of DM with (DM w) and without (DM wo) microangiopathy and controls



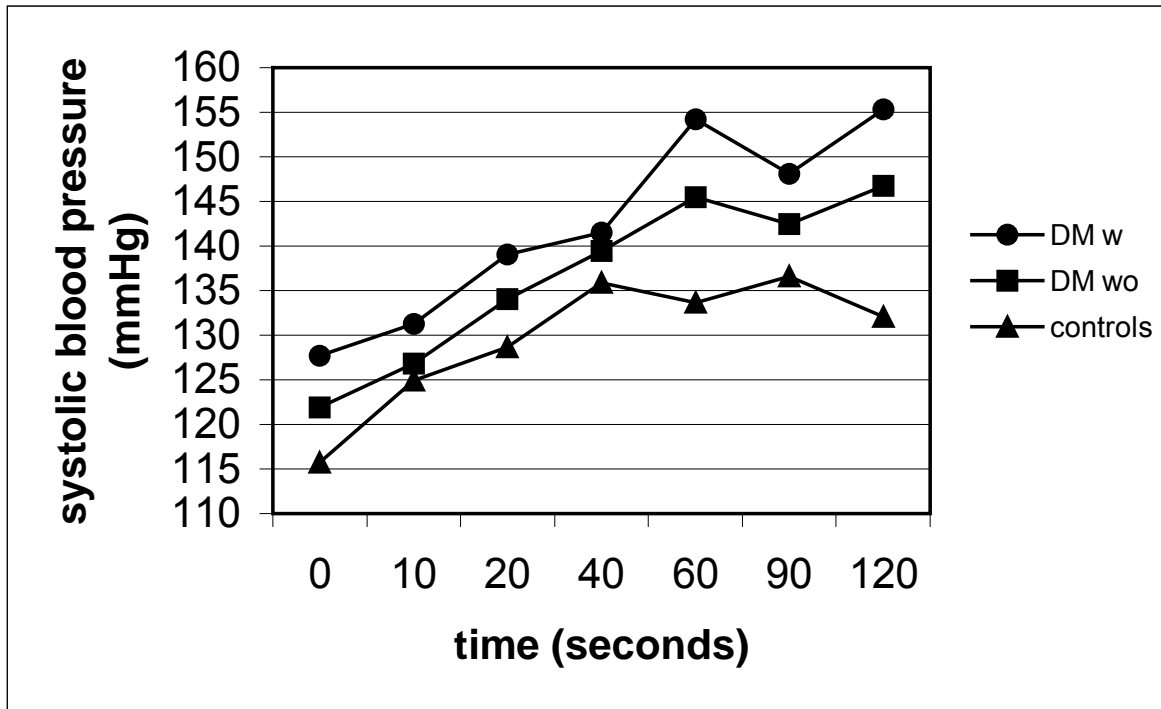


FIGURE 2 – Values of systolic blood pressure over 120 s in the groups of DM with (DM w) and without (DM wo) microangiopathy and controls

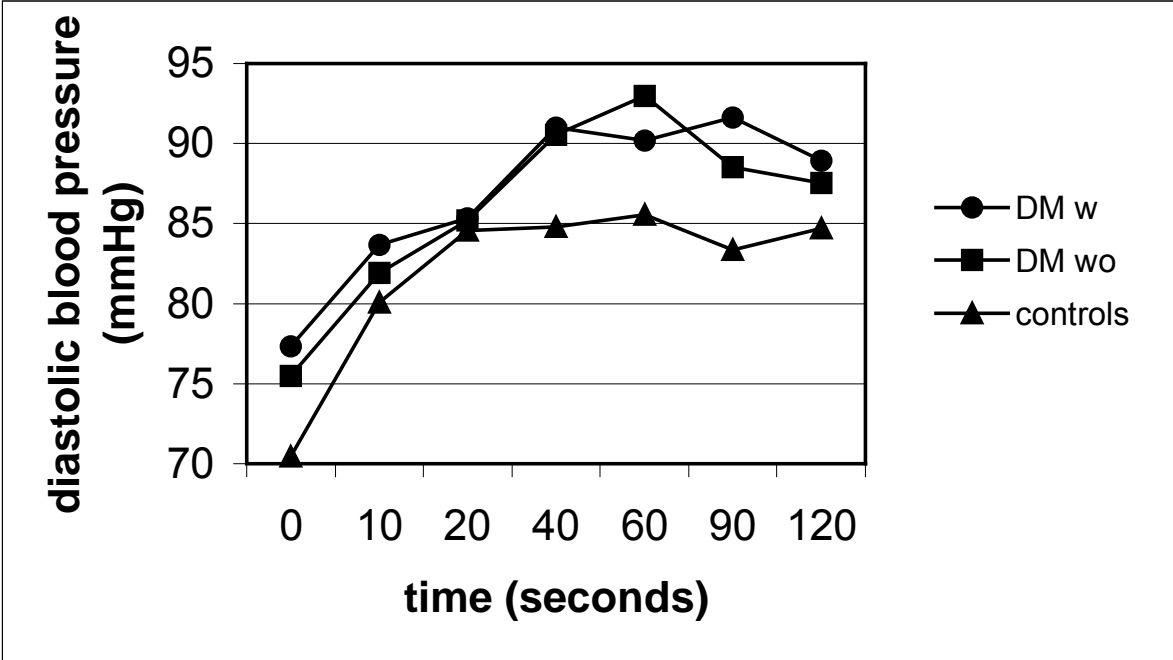


FIGURE 3 – Values of diastolic blood pressure for the cold face test over 120 s in the groups of DM with (DM w) and without (DM wo) microangiopathy and controls

## Artigo 2

**Retardo no descenso da resposta simpática à exposição da face ao frio no Diabetes Mellitus sem disfunção autonômica**

Brugnara L <sup>1</sup>, Chiyoshi C <sup>2</sup>, Neumann C <sup>3</sup>, Waldemar F <sup>4</sup>, Klein G <sup>5</sup>, Schmid H <sup>6</sup>

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) / Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA)

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas / Faculdade de Medicina / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) / Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA)

1. HCPA / ISCMPA / UFRGS
2. UFRGS
3. ISCMPA / UFRGS
4. UFRGS
5. UFRGS
6. HCPA / ISCMPA / UFRGS / FFFCMPA

Fonte de Financiamento: CNPq and FAPERGS

## Resumo

O presente estudo foi motivado pela busca de um teste capaz de estimular o sistema nervoso simpático cardíaco de pacientes diabéticos com e sem microangiopatia e indivíduos controles. Uma vez que a face costuma ser a última área que apresenta desnervação no Diabetes, optamos por realizar o teste do frio na face como estímulo simpático. Balões congelados nas regiões malares bilateral e frontal foram colocados em 15 diabéticos com microangiopatia, 17 sem microangiopatia e 49 indivíduos controles, em posição supina, por 120 segundos. A frequência cardíaca e a pressão arterial foram determinadas aos - 10, 0, 10, 20, 40, 60, 90 e 120 s. Antes de iniciar o teste, a PAS dos microangiopatas era 17,3% maior que a do grupo controle ( $p < 0,005$ ) e 8,4% maior que a dos sem microangiopatia ( $p < 0,003$ ). Os três grupos responderam com bradicardia e elevação das pressões arteriais sistólica e diastólica ao teste do frio. Em ambos os grupos de pacientes diabéticos, no entanto, houve um não descenso final da curva de respostas de PAS, diferente dos controles (sem microangiopatia,  $p = 0,004$ ; e com microangiopatia,  $p = 0,001$ ), sugerindo que em indivíduos diabéticos sem neuropatia autonômica descrita por Ewing uma hiperatividade simpática possa estar presente.

Palavras-chave: teste do frio na face; indivíduos controles; diabetes mellitus; atividade autonômica

## Introdução

O teste de exposição da face ao frio é uma forma utilizada para avaliar respostas do organismo a estímulos simpáticos. Em pacientes com Diabetes entendemos, que para ocorrer um estímulo simpático, o frio deva ser aplicado na face porque, assim como foi demonstrado por Low (1), esta área da pele costuma ser a última que apresenta desnervação como consequência da polineuropatia diabética.

Um estímulo para a função endotelial, similar ao obtido quando se estimula a face com frio, foi descrito quando se infunde acetilcolina diretamente nas artérias coronárias (2-3). Em resposta a este teste, observa-se que pacientes com Diabetes Mellitus freqüentemente apresentam resposta vasoconstritora paradoxal (3), a qual precede o achado de presença de placas de ateroma.

O estímulo do frio na face de pessoas com Diabetes pode, portanto, ser útil para, de forma não invasiva, avaliar as respostas a um estímulo simpático. Para que este estímulo ocorra, no entanto, é necessária a integridade da inervação simpática proveniente da área da face até a área cardíaca, quando as respostas da freqüência cardíaca e pressão arterial é que são avaliadas. Embora a resposta normal da freqüência cardíaca e pressão arterial ao estímulo com frio na face já tenha sido descrita em alguns estudos (4-9), pouco se sabe sobre as respostas de pessoas com Diabetes com e sem complicações crônicas a este estímulo.

Estudamos previamente 49 indivíduos aparentemente saudáveis, com 22 a 56 anos, 18 (36,7%) homens. Em posição supina, foram colocados balões congelados nas regiões malares bilateral e frontal, por 120 segundos e a freqüência cardíaca e a pressão arterial foram avaliadas. Foram observados: bradicardia, máxima entre os 40 e 60 segundos, elevação da pressão arterial sistólica, máxima entre 40 e 90 segundos, e elevação da pressão arterial diastólica, máxima aos 20 segundos. Não houve diferença no

comportamento das curvas quanto ao sexo, porém os homens apresentaram frequência cardíaca média mais baixa. Indivíduos com menos de 30 anos de idade responderam com menor aumento de PAS ao teste em relação aos com 40 anos ou mais.

O nosso grupo de pesquisa vem, há vários anos, se dedicando ao estudo das respostas do sistema autonômico no Diabetes. As arritmias cardíacas associadas a neuropatia autonômica do Diabetes determinam taxas importantes de mortalidade nestes pacientes. O presente estudo foi motivado pela busca de um teste capaz de estimular o sistema nervoso simpático cardíaco, e conseqüentemente, o endotélio coronariano de pacientes com Diabetes. A elevada morbi-mortalidade associada a neuropatia diabética com arritmia cardíaca nos faz buscar o seu melhor entendimento, avaliação e acompanhamento.

## **Pacientes e Métodos**

### **Pacientes**

Foram selecionados 32 pacientes diabéticos consecutivos entre os que compareceram ao ambulatório de Diabetes Mellitus do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, participantes das agendas deste grupo de pesquisa e que preenchiem os critérios de inclusão. Foram incluídos 18 pacientes diabéticos tipo 1 e 14 tipo 2, entre 20 e 60 anos, normotensos (pressão arterial sistólica menor que 140 e diastólica menor que 90 mmHg). Estes não apresentavam os critérios de exclusão para participar do estudo os quais foram etilismo, uso de drogas ilícitas, tabagismo, gestantes, uso de drogas vasoativas ou imunossupressoras, hipo ou hipertireoidismo, insuficiência renal, doença hipoxêmica ou cardiopatia isquêmica. A cardiopatia isquêmica foi identificada por ergometria e/ou cintilografia miocárdica com

dipiridamol positivos. Os pacientes inicialmente realizavam teste ergométrico. Se os resultados eram não conclusivos ou se os pacientes não apresentavam condições físicas se se submeter ao exame, eram encaminhados para cintilografia. Foram excluídos também pacientes que relatavam episódios de hipoglicemia nas 48 horas anteriores ao teste de estímulo com frio na face ou testes para avaliar a função autonômica.

Dos pacientes selecionados, 19 eram homens e 13 eram mulheres, todos brancos. Foram dosados glicemia em jejum, hemoglobina glicosilada, creatinina, potássio, uréia, lipídios plasmáticos (colesterol total, colesterol HDL, triglicerídios), exame qualitativo de urina (EQU), urocultura e microalbuminúria em urina de 24 horas, com o objetivo de avaliar o controle metabólico e a possibilidade de outras complicações crônicas do diabetes. O exame de TSH foi solicitado para excluir alterações funcionais tireoidianas, em especial o hipotireoidismo. A anamnese e o exame físico, bem como um ECG basal, foram registrados.

Os pacientes foram também avaliados quanto às suas respostas autonômicas através dos testes descritos por Ewing (10) e padronizados em nosso laboratório (11). Um consentimento informado foi obtido de todos os pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de ambos os hospitais.

Os pacientes diabéticos foram submetidos ao teste do frio (descrito abaixo) e, para análise, divididos em 2 grupos: 1) com doença microangiopática: alteração em fundoscopia e/ou microalbuminúria positiva, e 2) sem doença microangiopática.

#### Controles

Foram recrutados 49 indivíduos hígidos, pais de crianças que consultavam no ambulatório do hospital e outros voluntários, que sabiam não ser portadores de Diabetes Mellitus por avaliação glicêmica nos últimos 3 meses e sem história familiar de Diabetes

Mellitus, não hipertensos, com IMC menor que 25, 18 homens e 31 mulheres, com idades variando entre 20 e 56 anos para realização do teste do frio na face.

#### Caracterização da Doença Microangiopática

Utilizamos como indicativos ambulatoriais de doença microangiopática a presença de micro ou macroalbuminúria na urina de 24 horas e/ou a presença de retinopatia diabética (12-13), em testes realizados nos 6 meses anteriores ao teste do frio na face. Foram considerados normoalbuminúricos os pacientes com dosagens de microalbuminúria em urina de 24 horas inferior a 30 mg, microalbuminúricos entre 30 e 300 mg e macroalbuminúricos se as dosagens ultrapassassem as 300 mg. Urocultura e exame qualitativo de urina (EQU) foram avaliados nas mesmas coletas para exclusão de infecção urinária concomitante, o que alteraria os resultados. Os resultados anormais foram confirmados por novas coletas de urina de 24 horas. A fundoscopia foi realizada 10 minutos após a dilatação pupilar com colírio de tropicamida a 0,5% por um oftalmologista. A presença de retinopatia foi diagnosticada quando estavam presentes microaneurismas e hemorragias puntiformes, associados ou não a exsudados duros ou algodonosos. Quando se observou a presença de neovascularizações ou quando havia sinais de panfotocoagulação na retina, a retinopatia foi classificada como proliferativa.

#### Caracterização da Neuropatia Autonômica

Anormalidades da função autonômica foram definidas através do uso de testes cardiovasculares de Ewing (10) e padronizados por Neumann (11). Foram considerados indivíduos não neuropatas os que apresentaram 0 ou 1 teste alterado, neuropatas moderados os que apresentam 2 a 3 testes alterados e neuropatas graves os que apresentam os 4 testes alterados.



## Dosagens Laboratoriais

As dosagens laboratoriais foram realizadas nos laboratórios de rotina do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Laboratórios de Bioquímica e Radioimunoensaio. As amostras de sangue para análise bioquímica foram obtidas após um jejum noturno de 12 horas. As amostras de sangue e urina foram coletadas em um dia próximo à testagem do frio para dosagens de glicemia de jejum (método de Glico-DH), HbA1c (HPLC Hitachi L-9100®), creatinina (Jaffé sem desproteinização), potássio (potenciometria indireta [ISE]), uréia (UV GHID 2 [Mega Bayer®]), colesterol total (CHOD-PAP), colesterol HDL (método direto por inibição seletiva [Mega Bayer®]), triglicerídios (método GOD – PAP [Mega Bayer®]), TSH (quimiluminescência [Imulite®]), microalbuminúria (imunoturbidimetria - microalbi [Bayer®]), EQU e urocultura da rotina.

## Teste do Frio na Face

O frio foi aplicado na face com o objetivo de produzir ativação simpática conforme descrito por Heath e Downey (8). Após repouso em decúbito dorsal por 30 minutos, três balões de borracha cheios de água congelada foram colocados na face (regiões frontal e malar) dos pacientes em estudo por um período de 2 minutos (8,14). A pressão arterial (PA) foi medida em condições basais e durante o teste, nos tempos -10, 0, 10, 20, 40, 60, 90 e 120 segundos.

A frequência cardíaca (FC) e o ritmo cardíaco foram avaliados com monitorização cardíaca contínua e a FC registrada nos mesmos tempos acima. Para obtenção mais rápida e precisa dos resultados, o paciente era monitorizado com 2 esfigmomanômetros digitais (braços direito e esquerdo) e os valores eram obtidos de forma alternada (PA em -10 segundos no braço direito, 0 segundos no esquerdo, 10 segundos no braço direito e assim sucessivamente).

Três avaliadores participaram do teste: o primeiro e o segundo controlando e registrando as frequências cardíacas e pressões arteriais (braços direito e esquerdo) e o terceiro acompanhando a monitorização cardíaca contínua e coordenando as tomadas de pressão arterial e tempo.

A todos os pacientes foi solicitado não ingerir qualquer medicação, exceto para o controle glicêmico, nas 48 horas que antecedessem aos testes. Instruções foram dadas para suspensão de toda ingestão de cafeína pelo menos por 24 horas antes. Os testes para neuropatia autonômica e do frio foram realizados em tardes diferentes. Todos sujeitos foram estudados no período entre 16 e 20 horas do dia. Os pacientes permaneciam em repouso, em decúbito dorsal, por 30 minutos antes do início dos testes, em uma sala com temperatura estável de 24 a 25 °C.

#### Análise Estatística

Para comparação entre os grupos (Diabetes Mellitus sem microangiopatia, com microangiopatia e controles) quanto às variáveis categóricas, como sexo e tipo de Diabetes, foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para comparação entre os grupos quanto aos seus estados metabólicos, quantitativos, foi utilizado o teste t, de Student (índice de massa corporal [IMC], colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídios, creatinina, hemoglobina glicosilada [HbA1c] e glicemia, idade).

Para comparação entre os valores basais e as respostas obtidas de frequência cardíacas e pressões arteriais sistólica e diastólica entre os três grupos em estudo (diabéticos sem microangiopatia, diabéticos com microangiopatia e controles), foi realizada análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). Para avaliação da variação das médias das frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica em relação aos basais (variação dos pontos ao longo do tempo), foi utilizada a avaliação intra-sujeitos, teste de Greenhouse – Geisser. Foram considerados como pontos médios

das curvas um valor calculado por média aritmética a partir dos resultados obtidos nas 6 respostas ao longo dos 120 segundos (tempos 10, 20, 40, 60, 90 e 120). Para comparação destes pontos médios das curvas foi utilizado o teste “*between subjects*”. Para diferenças no comportamento das curvas (inclinação das curvas) dos grupos foram estudados os componentes de interação entre os sujeitos (teste within subjects – Greenhouse – Geisser).

As análises das freqüências cardíacas e pressões arteriais foram corrigidas para idade, utilizando a idade como uma covariável da ANOVA (ANCOVA).

O nível de significância considerado no estudo foi de  $P < 0,05$ .

## **Resultados**

### a) Características gerais dos indivíduos avaliados:

Os indivíduos foram alocados em um dos 3 grupos de estudo: pacientes diabéticos sem microangiopatia (17 indivíduos), pacientes diabéticos com microangiopatia (15 indivíduos) e indivíduos aparentemente sadios (49 controles). Buscamos parear conforme a idade.

As características gerais dos grupos estudados, assim como o controle metabólico dos diabéticos, estão descritos na tabela I.

Observa-se que o controle metabólico não foi diferente entre os grupos para as variáveis colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicerídios, glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada e creatinina. Todos os pacientes apresentaram níveis normais de TSH. Não houve diferenças entre a distribuição dos resultados destas variáveis dos

pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 para os grupos de pacientes diabéticos com e sem microvasculopatia.

Entre os diabéticos, os portadores de doença microangiopática apresentaram idade mais avançada ( $p = 0,013$ ) bem como maior tempo de Diabetes em relação ao grupo sem doença microangiopática ( $p = 0,033$ ), o que é compatível com a história natural da doença. O grupo controle teve idade semelhante ao grupo de diabéticos sem microangiopatia.

Foram realizados testes de neuropatia autonômica, conforme descritos, e apenas 3 pacientes apresentaram 1 teste cardiovascular alterado.

#### b) Avaliação da frequência cardíaca antes e durante a exposição da face ao frio

##### b.1) Basal

Em indivíduos diabéticos, a frequência cardíaca se mostrou 8% maior ( $p < 0,027$ ) no basal ( $76,2\text{bpm} \pm 13,3$ ) em relação aos controles ( $70,5 \pm 9,7$ ). Os diabéticos com microangiopatia apresentaram FC média de  $74 \pm 12,4$ , e os sem microangiopatia FC média de  $77 \pm 13,9$  ( $p = 1$ ). Uma vez havendo esta separação entre pacientes diabéticos, perdeu-se a diferença em relação aos controles: não houve diferença entre a frequência cardíaca basal dos controles e dos diabéticos sem microangiopatia ( $p = 0,08$ ), assim como dos controles e dos com microangiopatia ( $p = 0,64$ ).

##### b.2) Resposta da frequência cardíaca à exposição da face ao frio

Os resultados obtidos para medidas da frequência cardíaca para os 3 grupos em estudo (diabéticos sem microangiopatia, diabéticos com microangiopatia e controles) para o teste do frio são apresentados na Tabela II e Figura 1. Não houve diferença significativa na variação dos pontos ao longo do tempo a partir dos seus pontos iniciais

( $p = 0,17$ ). Não houve diferença entre os pontos médios das curvas dos diabéticos sem e com microangiopatia e controles ( $p = 0,092$ ). Também não foi observada diferença no comportamento das curvas dos grupos estudados ( $p = 0,83$ ).

c) Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) antes e durante a exposição da face ao frio

c.1) Basal

Em indivíduos diabéticos, a pressão arterial sistólica basal foi 10,3% maior ( $124,2 \text{ mmHg} \pm 12,9$ ) do que em controles ( $112,6 \pm 12,6$ ,  $p < 0,05$ ). A pressão arterial sistólica dos microangiopatas ( $132 \pm 11,5$ ) foi 8,4% maior que nos não microangiopatas ( $121,7 \pm 12,6$ ,  $p = 0,03$ ). Os diabéticos sem microangiopatia apresentaram PAS basal semelhante aos controles ( $p = 1$ ) e os com microangiopatia apresentaram PAS basal 17,3% maior que os controles ( $p = 0,005$ ).

c.2) Resposta da PAS à exposição da face ao frio

Os resultados obtidos para medidas das pressões arteriais sistólica e diastólica para o teste do frio são apresentados na Tabela III e Figura 2. Na análise realizada para avaliação das pressões sistólicas (ANOVA), houve tendência a variação dos pontos ao longo do tempo a partir dos seus pontos iniciais ( $p = 0,072$ ), diferença entre os pontos médios das curvas dos controles, diabéticos sem e com microangiopatia ( $p = 0,004$ ) e diferença no comportamento de respostas das curvas ao longo dos 120 segundos dos grupos estudados ( $p = 0,001$ ).

Analisando mais detalhadamente esta diferença de comportamento das curvas das pressões sistólicas, comparamos os grupos par a par (ANOVA para medidas repetidas). Obtivemos os seguintes resultados: diferença de inclinação da curva de diabéticos sem microangiopatia em relação a controles ( $p = 0,004$ ), diferença de

inclinação da curva de diabéticos com microangiopatia em relação a controles ( $p = 0,001$ ) e valores similares para diabéticos sem e com microangiopatia ( $p = 0,46$ ).

d) Avaliação da pressão arterial diastólica (PAD) antes e durante a exposição da face ao frio

d.1) Basal

Em indivíduos diabéticos, a pressão arterial diastólica basal foi 13% maior ( $78,2 \text{ mmHg} \pm 7,4$ ) do que em controles ( $69,2 \pm 9,5$ ,  $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre as pressões arteriais diastólicas basais entre os diabéticos com ( $80 \pm 6,8$ ) e os sem microangiopatia ( $75,6 \pm 8$ ,  $p = 0,47$ ). Os microangiopatas apresentaram PAD basal 15,6% maior que os controles ( $p < 0,001$ ). Os não microangiopatas tenderam a apresentar PAD basal 9,2% maior que os controles ( $p = 0,051$ ).

d.2) Resposta da PAD à exposição da face ao frio

Os resultados obtidos para medidas das pressões arteriais diastólicas para o teste do frio são apresentados na Tabela III e Figura 3. Houve diferença na variação dos pontos ao longo do tempo das curvas de pressão arterial diastólica a partir dos seus pontos iniciais ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença entre os pontos médios das curvas dos diabéticos sem e com microangiopatia e controles ( $p = 0,17$ ) e não houve diferença no comportamento de respostas das curvas ao longo dos 120 segundos dos grupos estudados ( $p = 0,09$ ).

Em resumo, os pontos basais das curvas de frequência cardíaca, pressões arteriais sistólica e diastólica foram maiores em diabéticos em relação a controles. O Diabetes provoca alterações na resposta das frequência cardíaca e pressões arteriais sistólica e diastólica ao longo dos 120 segundos do teste do frio, significativamente diferente apenas quanto aos dois últimos parâmetros. As curvas das frequências

cardíacas não tiveram comportamentos diferentes entre os três grupos, assim como das pressões arteriais diastólicas. Os pacientes diabéticos com e sem microangiopatia apresentaram comportamento (inclinação) da curva de pressão arterial sistólica diferente da dos controles: houve um não descenso, ou uma atenuação do descenso final da curva.

## **Discussão**

No presente estudo avaliamos indivíduos com Diabetes Mellitus os quais foram comparados com controles aparentemente saudáveis. O grupo de pacientes diabéticos estudado apresentou maior frequência cardíaca, sugerindo a possibilidade de presença de disautonomia, provavelmente leve, já que as respostas aos testes cardiovasculares estavam discretamente comprometidas em apenas três pacientes diabéticos.

O teste do frio na face é um teste de estímulo simpático e parassimpático que apresenta respostas conhecidas em indivíduos normais, já descritas por vários autores (6-8, 15-16) e pelo nosso grupo. No presente estudo selecionamos pacientes diabéticos sem evidência de neuropatia autonômica identificada pelos testes clássicos de Ewing (10). Realizamos o teste do frio na face com o objetivo principal de estímulo simpático. Constatamos algumas diferenças nas respostas de pacientes diabéticos em relação aos controles.

Inicialmente identificamos que os pacientes diabéticos com e sem microangiopatia respondem ao teste do frio na face apresentando elevação das pressões arteriais sistólica e diastólica e diminuição da frequência cardíaca, assim como ocorre em indivíduos controles. Os resultados indicaram que os indivíduos testados apresentaram inervação simpática e parassimpática suficientes para serem estimulados. O fato está de acordo com estudos que caracterizam a inervação autonômica do corpo através do teste de

avaliação da sudorese (1). Os pacientes diabéticos com e sem microangiopatia, além disso, apresentaram curva de pressão arterial sistólica diferente da curva dos controles: houve um não descenso, ou uma atenuação do descenso final da curva. Se extrapolarmos para a ocorrência de não descenso noturno da pressão arterial, o achado poderia estar refletindo uma hiperatividade simpática. Estudos vêm demonstrando associação entre hiperatividade simpática e alterações microangiopáticas do Diabetes (17-18). Lindmark (19) sugere que já existe uma atenuação da atividade parassimpática em parentes de 1º grau não diabéticos de pacientes com Diabetes tipo 2, apontando para associação entre hiperatividade simpática e resistência à insulina.

A hiperatividade simpática correlaciona-se com hiperatividade e hiperreatividade endotelial. A resposta circulatória normal a um estímulo simpático é a vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo miocárdico (20). Nitenberg (3) infundiu acetilcolina em pacientes diabéticos e controles e identificou que os diabéticos apresentavam vasoconstrição coronariana, enquanto os controles, vasodilatação. Com um estímulo simpático como o descrito, achados similares em relação à vasoconstrição provavelmente seriam obtidos.

Sendo assim, os achados obtidos no estudo em pauta mostram que o estímulo do frio na face pode ser útil para produzir resposta simpática e provavelmente vasoconstrição coronariana quando realizado em pacientes com disfunção coronariana endotelial. Por outro lado, a resposta da frequência cardíaca e pressão arterial ao estímulo do frio na face poderiam mostrar desnervação autonômica se o teste for realizado em pessoas com disfunção simpática ou parassimpática. Outros estudos poderão definir melhor esta possibilidade.



## Referências

1. Low PA & Fealey RD (1999). Sudomotor Neuropathy In: Peter J Dick & PK Thomas *Diabetic Neuropathy – 2<sup>nd</sup> ed*, Saunders Company, USA
2. Horio Y, Yasue H, Rokutanda M, Nakamura N, Ogawa H, Takaoka K, Matsuyama K & Kimura T (1986). Effects of intracoronary injection of acetylcholine on coronary arterial diameter. *American Journal Cardiology*, 57: 984-89
3. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E & Attali J-R (1993). Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilatation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes*, 42: 1017-25
4. Kawakami Y, Natelson BH & DuBois AB (1967). Cardiovascular effects of face immersion and factors affecting diving reflex in man. *Journal of Applied Physiology*, 23(6):964-70
5. Heistad DD, Abboud FM & Eckstein JW (1968). Vasoconstrictor response to simulated diving in man. *Journal of Applied Physiology*, 25 (5): 542-49
6. Khurana RK, Watabiki S, Hebel JR, Toro R & Nelson E (1980). Cold face test in the assessment of trigeminal-brainstem-vagal function in humans. *Annals of Neurology*, 7: 144-49
7. Finley JP, Bonet JF & Waxman MB (1979). Autonomic pathways responsible for bradycardia on facial immersion. *Journal of Applied Physiology*, 47(6): 1218-22
8. Heath M E & Downey J A (1990). The cold face test (diving reflex) in clinical autonomic assessment: methodological considerations and repeatability of responses. *Clinical Science*, 78: 139-47

9. Allen MT, Shelley KS & Boquet AJ Jr (1992). A comparison of cardiovascular and autonomic adjustments to three types of cold stimulation tasks. *International Journal of Psychophysiology*, 13 (1): 59-69
10. Ewing DJ & Clarke BF (1982). Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *British Medical Journal*, 285: 916-18
11. Neumann C & Schmid H (1997). Standardization of a computerized method for calculating autonomic function tests responses in healthy subjects and patients with diabetes mellitus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30: 197-205
12. Clark CM & Lee DA (1995). Prevention and Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*; 332:1210-17
13. Ferris FL, Davis MD & Aiello LM (1999). Treatment of Diabetic Retinopathy. *New England Journal of Medicine*; 341: 667-78
14. Neill WA, Duncan DA, Kloster F & Mahler DJ (1974). Response of coronary circulation to cutaneous cold. *American Journal of Medicine*, 56: 471-76
15. Wildenthal K, Leshin SJ, Atkins JM & Skelton CL (1975). The diving reflex used to treat paroxysmal atrial tachycardia. *Lancet* i: 12-14
16. Treiber FA, Musante L, Braden D, Arensman F, Strong W, Levy M & Leverett S (1990). Racial differences in hemodynamic responses to the cold face stimulus in children and in adults. *Psychosomatic Medicine* 52: 286–96
17. Pecis M, Azevedo MJ, Moraes RS, Ferlin EL & Gross JL (2000). Autonomic dysfunction and urinary albumin excretion rate are associated with an abnormal blood pressure pattern in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 23(7): 989-93
18. Vörös P, Lengyel Z, Nagy V, Németh C, Rosivall L & Kammerer L (1998). Diurnal blood pressure variation and albuminuria in normotensive patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13: 2257-60

19. Lindmark S, Wiklund U, Bjerle P & Eriksson JW (2003). Does the autonomic nervous system play a role in the development of insulin resistance? A study on the heart rate variability in first-degree relatives of type 2 diabetes patients and control subjects. *Diabetic Medicine*, 20: 399-405
20. Grambow D, Dayanikli F, Muzik O, Sutor R, Rubenfire M, Werns S & Schwaiger M (1993). Assessment of endothelial function with PET cold pressor test in patients with various degrees of coronary atherosclerosis. *Journal Nuclear Medicine*, 34: A137

TABELA I – CARACTERÍSTICAS GERAIS

	Controles	DM sem microangiopatia	DM com microangiopatia	P
no. Sujeitos	49	17	15	-
Idade (anos)*	32,8 ± 10,2	36,5 ± 13,1	47,0 ± 8,2	0,013 ‡
Sexo (% homens)	36,7	52,9	66,6	0,09
tempo DM (anos)*	-	6,8 ± 4,3	13,6 ± 8,7	0,033 ‡
tipo DM (% DM2)	-	41,1	46,6	0,33
IMC (kg/m <sup>2</sup> )*	-	25,1 ± 3,0	24,0 ± 2,1	0,38
Glicemia (mg/dl)*	-	174,4 ± 90,6	178,5 ± 129,3	0,86
HbA1c (%)*	-	6,28 ± 1,3	6,4 ± 1,3	0,97
Colesterol total (mg/dl)*	-	187,5 ± 40,1	187,7 ± 36,6	0,93
Colesterol HDL (mg/dl)*	-	46,6 ± 10,5	47,1 ± 17,8	0,99
Colesterol LDL (mg/dl)*	-	116,2 ± 26,7	120,6 ± 32,2	0,66
Triglicerídios (mg/dl)*	-	116,1 ± 85,6	98,6 ± 47,1	0,65
Creatinina (mg/dl)*	-	0,72 ± 0,10	0,84 ± 0,17	0.1
TNA (1 teste alterado) -no. Pacientes **	-	1	2	
Fundoscopia (retinopatia)	-	Normal	Não proliferativa – 92,8% (13 pacientes) Proliferativa – 7,25% (1 paciente)	†
EUA (> 30 mg/L)**	-	Negativa	Microalbuminúria – 80% (4 pacientes) Macroalbuminúria – 20% (1 paciente)	†

\* média ± desvio padrão

\*\* TNA: teste de neuropatia autonômica

EUA: excreção urinária de albumina

‡ estatisticamente diferentes entre DM sem e com microangiopatia

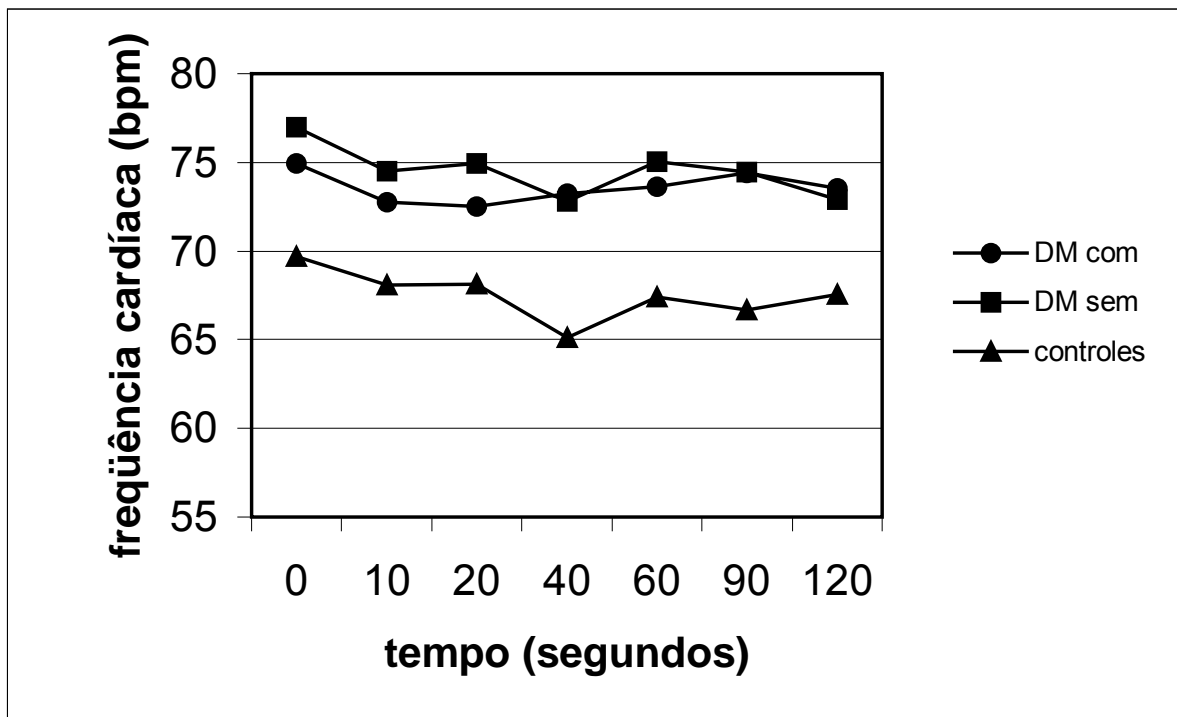
† diferentes

**TABELA II** – Variação da frequência cardíaca durante o teste do frio em controles, diabéticos sem microangiopatia e diabéticos com microangiopatia - médias, intervalos de confiança (IC) - e comparação entre os grupos

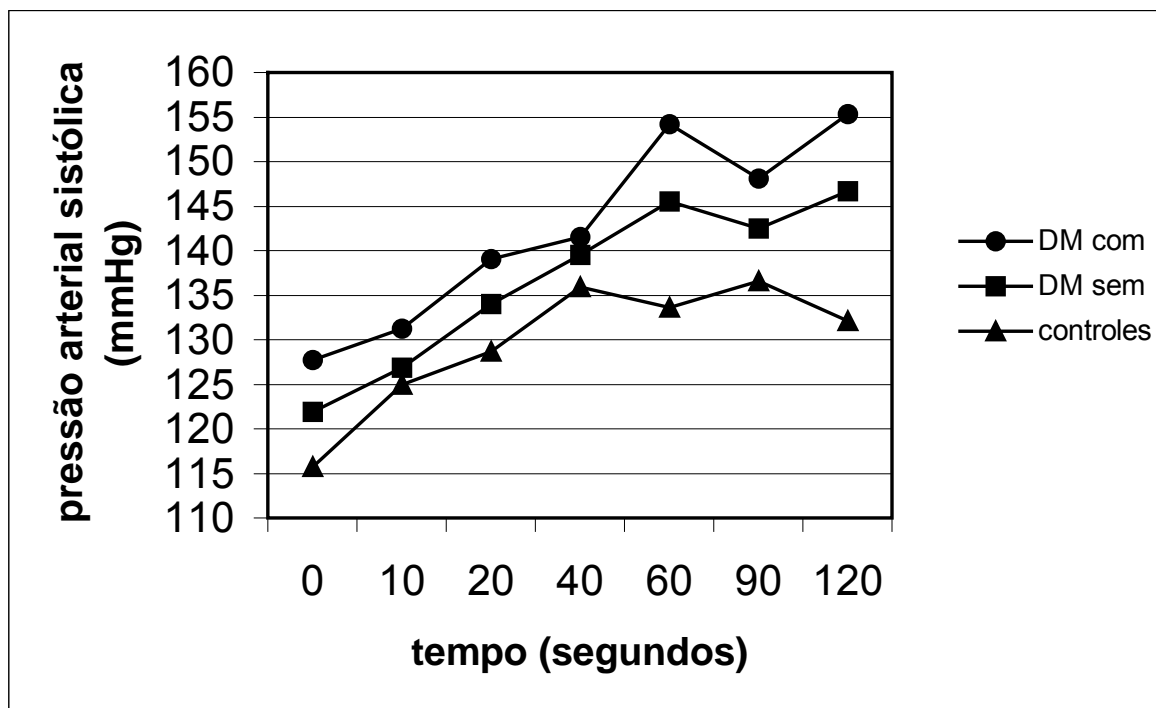
TEMPO (segundos)	Controle FC média (bpm) e IC (95%)	DM sem microangiopatia FC média (bpm) e IC (95%)	DM com microangiopatia FC média (bpm) e IC (95%)
0	69,9 (66,8 – 73,1)	76,9 (71,6 – 82,3)	74 (68,3 - 79,7)
10	68 (64,4 – 71,6)	74,5 (68,4 - 80,6)	73 (66,5 - 79,4)
20	68,1 (64,6 – 71,7)	74,9 (68,8 – 81)	72,4 (65,9 - 78,8 )
40	65 (61,1 – 68,8)	72,8 (66,2 - 79,3)	73,5 (66,5 - 80,4)
60	67 (63,2 – 70,8)	75 (68,5 - 81,5)	74,6 (67,7 - 81,4)
90	66,5 (62,7 - 70,3)	74,4 (68 - 80,9)	74,8 (67,9 - 81,6)
120	67,4 (63,8 - 70,9)	72,9 (66,9 - 78,9)	74 (67,6 - 80,3)

**TABELA III:** Variação da Pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) durante o teste do frio em Controles, Diabéticos sem microangiopatia e Diabéticos com microangiopatia - médias, intervalos de confiança (IC) - e comparação entre os grupos

TEMPO (segundos)	PA (mmHg)	Controles	DM sem microangiopatia	DM com microangiopatia
		Média e IC (95%)	Média e IC (95%)	Média e IC (95%)
0	PAS	114,3 (110,6 -117,9)	122 (115,9 – 128)	132 (125,4 - 138,6)
	PAD	69,6 (67,1 - 72,1)	75,6 (71,3 - 79,8)	80 (75,5 - 84,5)
10	PAS	123,3 (119,2 -127,5)	127 (120,1 - 133,8)	136 (128,6 - 143,5)
	PAD	79,2 (76,4 – 82)	82 (77,3 - 86,6)	86,3 (81,3 - 91,3)
20	PAS	126,2 (122,3 – 130,2)	134,2 (127,8 - 140,7)	146,6 (139,5 - 153,6)
	PAD	83,5 (80,6 - 86,5)	85,2 (80,2 - 90,2)	88,5 (83,2 - 93,8)
40	PAS	133,4 (128,7 – 138)	139,7 (132 - 147,4)	149,2 (140,8 - 157,7)
	PAD	83,9 (80,7 - 87)	90,6 (85,2 – 96)	93,7 (88 - 99,4)
60	PAS	131,3 (126,7 -135,9)	145,7 (138,1 - 153,3)	161,4 (153,1 - 169,7)
	PAD	84,4 (81 - 87,9)	93 (87,2 - 98,9)	93,6 (87,4 - 99,8)
90	PAS	134,3 (129,5 - 139,2)	142,7 (134,7 - 150,6)	155,1 (146,4 - 163,8)
	PAD	82,7 (79,8 - 85,6)	88,5 (83,6 - 93,5)	93,6 (88,3 - 98,8)
120	PAS	129,6 (125,1 - 134,2)	146,9 (139,4 - 154,4)	162,8 (154,6 – 171)
	PAD	84 (80,9 - 87,1)	87,5 (82,3 - 92,8)	91,1 (85,5 - 96,7)

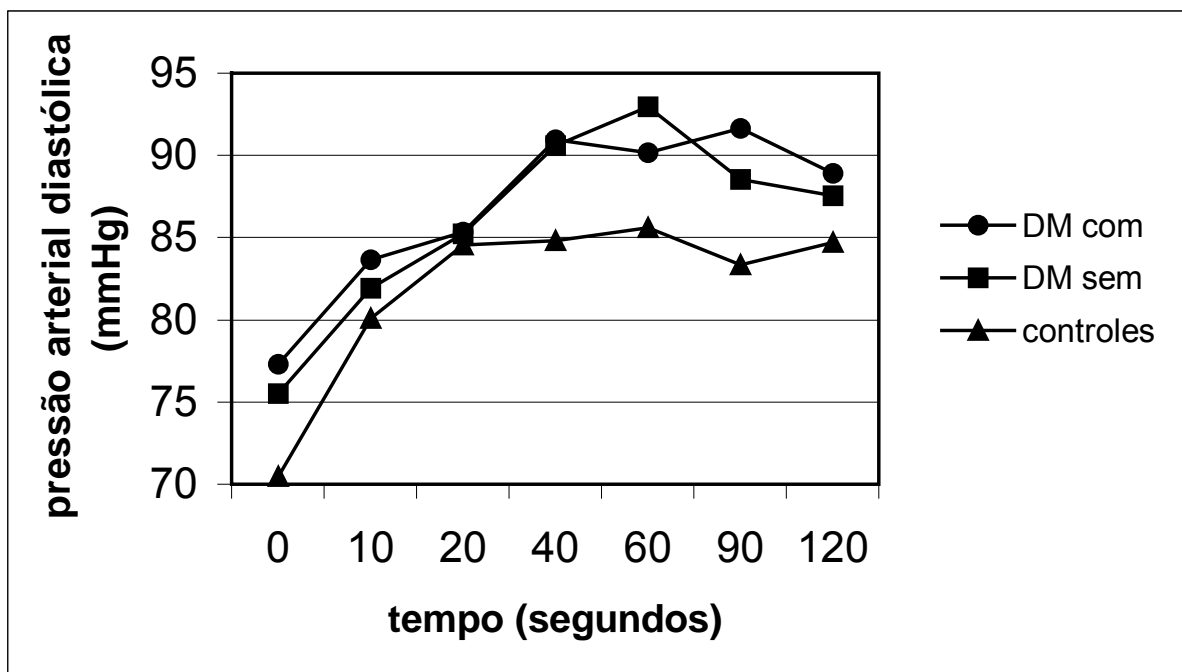


**FIGURA 1** – Valores da frequência cardíaca ao teste do frio ao longo de 120 segundos nos grupos DM sem (DM sem) e com microangiopatias (DM com) e controles



**FIGURA 2** - Valores da pressão arterial sistólica ao longo de 120 segundos nos grupos DM sem (DM sem) e com microangiopatias (DM com) e controles





**FIGURA 3** - Valores da pressão arterial diastólica ao teste do frio ao longo de 120 segundos nos grupos DM sem (DM sem) e com microangiopatias (DM com) e controles

**B891a** Brugnara, Laura

Avaliação da resposta autonômica simpática à exposição da face ao frio de indivíduos normais e de pacientes com Diabetes mellitus com e sem microangiopatia / Laura Brugnara ; orient. Helena Schmid. – 2004.

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Diabetes mellitus 2 Face : Fisiologia 3. Estudos de casos e controles 4. Manifestações neurológicas 5. Angiopatias diabéticas I. Schmid, Helena II. Título.

NLM: WK 810