

Impact of overweight on the normal physiology of human in vivo skin

Impacto do excesso de peso sobre a fisiologia normal da pele humana in vivo

**Liliana Tavares¹, Lídia Palma¹, Osvaldo Santos¹, M^a Angélica Almeida³, M^a Julia Bujan⁴
& L. Monteiro Rodrigues^{1,2}**

¹ Universidade Lusófona (CBIOS – Research Center for Health Science and Technologies), Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

² Dep. Pharmacological Sciences, Universidade de Lisboa – School of Pharmacy, Lisboa, Portugal

³ Serviço de Cirurgia Plástica e Reconstrutiva, HSJ-CHLC, Lisboa, Portugal

⁴ Universidade de Alcalá de Henares – School of Medicine, Madrid, Espanha

Email: f3872@ulp.pt; tavaresliliana@sapo.pt

Abstract

Obesity is an increasing public health issue, particularly in Portugal, where more than 50% of the population is obese. The pathophysiological consequences of being overweight have a severe cutaneous impact. However, there is still a lack of studies to link these alterations to BMI categories. This present work intends to identify the hydration and biomechanical behaviour changes related to weight augmentation. This transversal study was performed on a convenience sample of 57 volunteers, all females, aged between 20 and 46 (30±8) years old. Volunteers were divided in two groups – group I, with a BMI between 19,9 and 24,9 Kg/m² and group II, between 25 and 29,9 Kg/m². One single determination of the superficial hydration, transepidermal water loss and biomechanical behaviour of the skin, was obtained with non-invasive methods. The data showed that weight increase positively influences hydration levels and transepidermal water loss, and negatively influences the skin's biomechanical behaviour. Despite the relevance of these results, there is still a need for complementary studies, with a wider number of individuals, in order to better understand its nature and meaning.

Keywords: overweight; BMI; skin hydration; TEWL; elasticity.

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública com prevalência crescente, nomeadamente em Portugal, onde mais de 50% da população é obesa. As consequências fisiopatológicas do peso excessivo têm grande impacto a nível cutâneo. Contudo, existem ainda poucos estudos sobre a fisiologia cutânea, não existindo qualquer estratificação destas alterações em função do peso corporal. O presente estudo pretende contribuir para o estudo das alterações ao nível da hidratação e comportamento biomecânico com o aumento de peso. Este estudo transversal foi efetuado numa amostra de conveniência de 57 voluntárias, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 20 e os 46 (30±8) anos. As voluntárias foram divididas em dois grupos - Grupo I, com IMC entre 19,9 e 24,9 Kg/m² e Grupo II, entre 25 e 29,9 Kg/m². Foi efetuada uma única determinação da hidratação superficial, perda transepidérmica de água e comportamento biomecânico da pele (métodos não-invasivos). Os dados obtidos permitem-nos verificar que o aumento de peso influencia positivamente os níveis de hidratação e perda transepidérmica de água e de forma negativa o comportamento biomecânico da pele. Apesar do interesse destes resultados torna-se necessário realizar mais estudos, com maior número de indivíduos, de forma a melhor esclarecer a sua natureza e significado.

Palavras-chave: excesso de peso; IMC; hidratação cutânea, PTEA, elasticidade.

Introduction

Obesity is a pathology that clearly represents a public health issue, and has been increasing worldwide in the last years^[1-4]. In Portugal, the last published studies revealed that more than 50% of the population is obese^[5,6]. The overweight physiopathology consequences have a major impact on different levels, and contribute to a higher risk of related comorbidity^[7]. The impact on the skin is well documented, showing a direct relationship between morbid obesity and various dermatoses, including acanthosis nigricans, amongst others^[7]. There are also studies that describe some changes in the skin physiology of morbidly obese individuals, reporting essentially a decrease in hydration and an increase in transepidermal water loss^[7-9]. Nevertheless, besides this correlation, the impact of excess weight and obesity on the skin's physiology, particularly in parameters such as hydration, barrier function or biomechanical behaviour, still needs a thorough investigation. Until now, there has not been any study that allows us to identify the classes of BMI in which the cutaneous changes associated to weight increase start to be noticed. In this case, unlike other markers^[10], there is no evidence of any expected tendency for these markers.

This study aims to contribute to a stratification of the characteristics of skin physiology regarding the BMI variation, comparing normoponderal individuals to overweight or pre-obese individuals (according to the WHO classification)^[11].

Material and Methods

For this transversal study, and after an informed written consent, a convenience sample of 57 female volunteers was selected, aged between 20 and 46 years old (30 ± 8 years old), according to previous inclusion criteria. All the procedures were previously assessed by the Institutional Ethics Committees and according to the Helsinki Declaration principles and its subsequent amendments^[12-15].

Volunteers were divided in two groups – group I, with a BMI between 19,9 and 24,9 Kg/m² and group II, between 25 and 29,9 Kg/m². The BMI classification followed the WHO criteria^[11,16], and was calculated using the Quetelet's formula: $BMI = \text{weight (Kg)} / \text{height (m}^2\text{)}$ ^[17]. Pregnancy, skin markings (naevus) in the experimental area and addictions (tobacco or alcohol) were considered as non-inclusion criteria. The

Introdução

A obesidade é uma patologia que representa um problema de saúde pública com prevalência crescente nos últimos anos, a nível mundial^[1-4]. Em Portugal, os últimos estudos publicados sobre este tema revelam que mais de 50% da população é obesa^[5,6]. As consequências fisiopatológicas do peso excessivo têm grande impacto a diversos níveis aumentando do risco de ocorrência de co-morbilidades relacionadas^[7]. A nível cutâneo, o impacto da obesidade está bem documentado, com a evidência de uma relação direta entre a obesidade mórbida e o aparecimento de diversas dermatoses incluindo a acantosis nigricans entre outras^[7]. Existem estudos que descrevem algumas alterações na fisiologia cutânea nos obesos mórbidos, referindo-se essencialmente a uma diminuição da hidratação e a um aumento da perda transepidérmica de água^[7-9]. Contudo, para além desta correlação, o impacto do excesso de peso e da obesidade na fisiologia cutânea, nomeadamente em parâmetros como a hidratação, função barreira ou comportamento biomecânico, está ainda pouco estudado. Não existe, até ao momento, qualquer estudo que estratifique estas alterações ou que nos permita perceber o IMC a partir do qual se começam a manifestar as alterações cutâneas relacionáveis com o aumento de peso. Ao contrário de outros indicadores^[10], aqui, não se percebe ainda qual a tendência evolutiva dos indicadores de hidratação e comportamento biomecânico.

Este estudo tem como objetivo contribuir para a estratificação das características da fisiologia cutânea com a variação de IMC, comparando indivíduos normoponderais e indivíduos com excesso de peso, ou pré-obesos, segundo a classificação da OMS^[11].

Materiais e Métodos

Para a realização deste estudo transversal, foi selecionada, após consentimento informado, uma amostra de conveniência de 57 voluntárias, do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 20 e os 46 (30 ± 8) anos de idade, segundo critérios prévios de inclusão. Todos os procedimentos foram previamente avaliados pelas Comissões de Ética Institucionais e conduzidas de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e emendas subsequentes^[12-15].

As voluntárias foram divididas em dois grupos: Grupo I, com IMC entre 19,9 e 24,9 Kg/m² e Grupo II, entre 25 e 29,9 Kg/m². A classificação do IMC seguiu os critérios da OMS^[11,16], sendo o mesmo calculado recorrendo à fórmula de Quetelet - $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ ^[17], expresso em Kg/m²^[17]. Os critérios que determinaram a exclusão/não inclusão de voluntárias incluíram o

anatomic area subjected to measurements could not be washed with soap or shower gel and no cosmetic could be applied in the 24 hours preceding the measurements. The consumption of coffee and/ or energetic drinks was also restricted.

Evaluations were performed in a laboratorial environment, avoiding any influence from heat or forced-air sources, according to previously published recommendations. Temperature and humidity were continuously controlled ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; $45 \pm 5\%$) and monitored during procedures^[18,19].

The barrier function was characterized through transepidermal water loss (TEWL), by the Tewameter TM300 (CK electronics, FRD) and expressed in $\text{g/m}^2/\text{h}$. Epidermal hydration was measured with the Moisturemeter SC (Delphin Technology D) and the Corneometer CM825 (CK electronics, FRD), both expressed in AU (arbitrary units). The envelope function was evaluated through the Cutometer MPA580 system (expressed in mm) and the Reviscometer RV600 (CK electronics, FRG), expressed in AU^[18-21]. In this case, a time/ strain measurement method was applied, using three suction cycles (3 seconds each one), followed by a relaxation period of 2 seconds, with a 8 mm diameter probe and a permanent suction pressure of 300 mbar^[20,21]. Chosen descriptors obtained through the suction pulse were - Ua/Uf (total elasticity of the skin including the pulse distension (Uf) and recovery (Ua)), Ur/Ue (elastic index), Uv/Ue (viscoelastic ratio) and Ua (total recovery). Regarding the Reviscometer system the RRTm (Ressonance Running Time – the average value of twelve measurements) and the Anisotropy (ratio between RRT maximum and RRT minimum)^[20,22] parameters were chosen.

Measurements took place in the anatomical areas where modifications are more significant during weight alteration – the face (frontal and zygomatic areas), breast and abdominal areas.

The statistical analysis (descriptive and comparative) was performed through the SPSS (v 20.0) software, using a univariated analysis with calculation of dispersion and central tendency measurements. Mean values were compared between group I and group II by non-parametric tests - Kruskal-Walis and Tukey tests. A significance level of 95% was adopted.

período de gravidez e/ou aleitamento, a presença de sinais cutâneos na área experimental, adicções (fumo de tabaco ou consumir álcool). As restrições resumiram-se a não lavar a área anatômica implicada com sabão ou gel de banho e a não aplicar produtos cosméticos nessas áreas, nas 24h que antecederam as medições, bem como a restrição de toma de bebidas específicas (café e bebidas energéticas).

As avaliações foram efetuadas em ambiente laboratorial e na ausência de fontes de calor e de convecção forçada, de acordo com metodologia e recomendações previamente publicadas. A temperatura e humidade mantiveram-se sob controlo durante todo o período de realização do estudo ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; $45 \pm 5\%$)^[18,19].

A função de “barreira” foi caracterizada através da medida da perda transepidérmica de água (PTEA), obtida com o Tewameter TM300 (CK electronics, FRD) expressa em $\text{g/m}^2/\text{h}$, a hidratação superficial epidérmica, medida através do Moisturemeter SC (Delphin Technology D) e do Corneometer (CK electronics, FRD), em ambos os casos expressa em UA (unidades arbitrárias), e a função de “envelope” avaliada através dos sistemas Cutometer MPA580, (expressa em mm) e do Reviscometer RV600 expressa em UA, da CK electronics (FRG)^[18-21]. Neste caso, utilizámos, na cutometria, o modo de medição time/strain utilizando três ciclos de sucção, de cerca de 3s seguido por um período de relaxamento de cerca de 2s, utilizando uma sonda de 8mm de diâmetro e uma pressão sucção constante de 300 mbar^[20,21]. Os descriptores escolhidos foram - Ua/Uf (elasticidade da pele, incluindo o pulso de distensão e de recuperação), Ur/Ue (elasticidade total), Uv/Ue (razão viscoelástica) e Ua (extensão viscoelástica), obtidos através do pulso de sucção que caracteriza este método. Para o sistema reviscometer, selecionamos o RRTm (Ressonance Running Time – valor médio de doze medições) e a Anisotropia (obtida pela razão entre o RRT máximo e o RRT mínimo)^[20-22].

As medições foram efetuadas em zonas anatômicas cujas modificações são mais significativas durante a alteração de peso - na face (zonas zigomática e frontal) e nas regiões mamária e abdominal.

A análise estatística (descritiva e comparativa) foi realizada através do programa SPSS (v 20.0) utilizando uma análise univariada com cálculo de medidas de tendência central e de dispersão. Foi efetuada a comparação de médias dos indicadores fisiológicos entre grupos amostrais, em função das categorias de IMC. Atendendo à reduzida dimensão da amostra, optou-se por testes não-paramétricos - teste de Kruskal-Walis e teste de Tukey, para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O nível de significância utilizado foi de 95%.

Results and Discussion

The following figures (1 and 2) summarize the quantitative data obtained through statistical analysis.

Resultados e Discussão

As figuras seguintes resumem os dados quantitativos obtidos através da análise estatística.

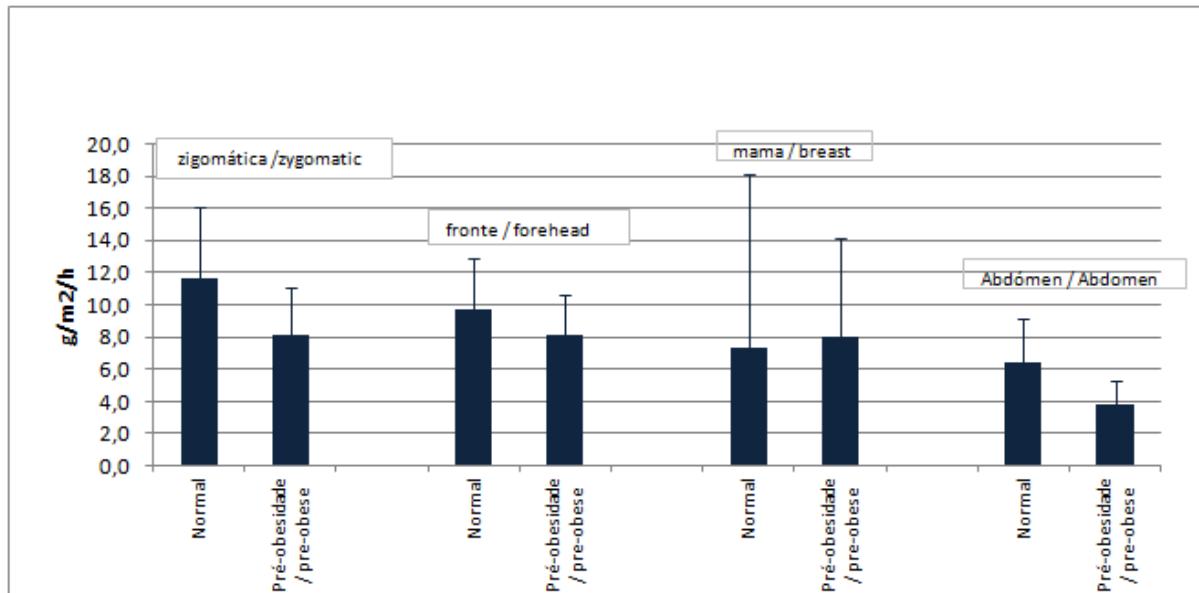


Figure 1 - Transepidermal water loss (TEWL), by anatomical area ($\alpha < 0,05$)
Figura 1 - Perda transepídermica de água (PTEA) por zona anatómica ($\alpha < 0,05$)

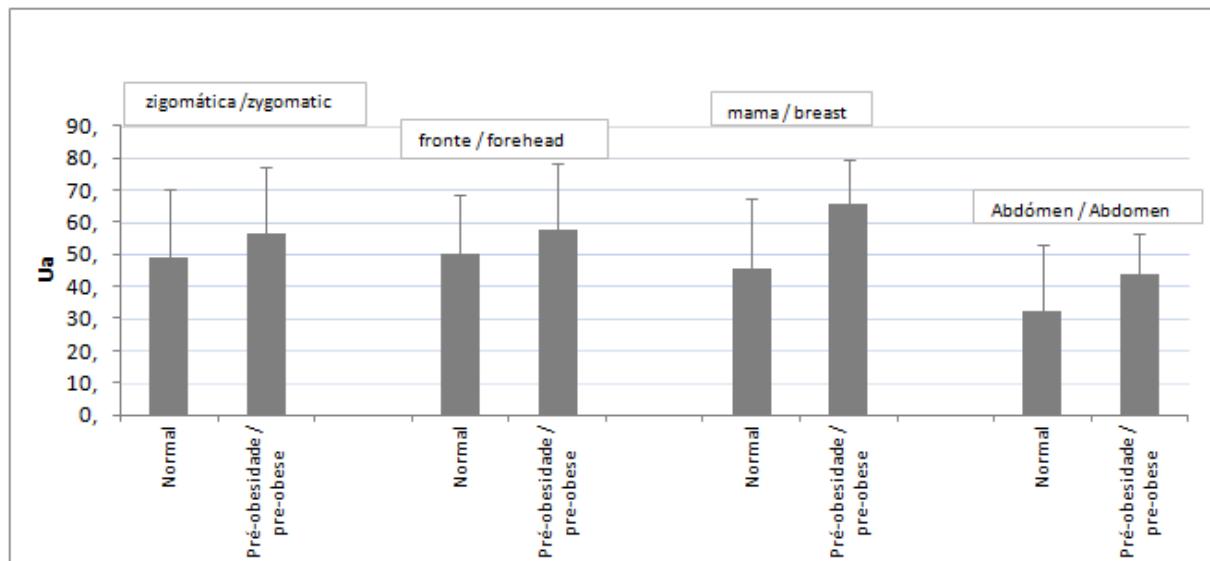


Figure 2 - Epidermal Hydration by anatomical area ($\alpha < 0,05$)
Figura 2 - Hidratação superficial, por zona anatómica ($\alpha < 0,05$)

We might notice that increasing BMI contributes positively to improving the integrity of skin barrier, with a clear tendency in all anatomical locations for a decrease in transepidermal water loss and an increase in epidermal hydration. Nevertheless, it was not possible to find statistically significant differences, probably due to the reduced "n" especially in group II (overweight). Previous studies only refer to obese individuals, nevertheless, these revealed a drier skin and a higher TEWL^[7-9], in contrast to what we have observed in this study. Regarding hydration indicators and skin barrier, a tendency to improve skin condition with weight gain was also noticed. This apparent paradox effect of obesity is found in other types of indicators and diseases^[10]. This is the case of the relationship between cardiovascular risk indicators showing an existence of a non-linear, U-shape. In this case, overweight could work as a protective factor regarding skin physiology^[10].

Através da análise das figuras 1 e 2, podemos verificar que o aumento do IMC contribui de forma positiva para uma melhoria da integridade da barreira cutânea, com uma tendência clara, em todas as zonas anatómicas, para a diminuição dos valores de perda transepidermica de água e aumento da hidratação superficial. Não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas, provavelmente por causa do "n" utilizado, especialmente no grupo II (pré-obesos). Os estudos publicados apenas visam indivíduos obesos, contudo, os mesmos sugerem que os indivíduos obesos apresentam pele mais seca e maior PTEA^[7-9], contrariamente ao observado aqui. Observa-se, especialmente ao nível dos indicadores da hidratação e da barreira cutânea, que existe uma tendência para melhoria do estado da pele com o aumento de peso. Este aparente paradoxo dos efeitos da obesidade é encontrado para outro tipo de indicadores e patologias^[10]. É o caso da evolução dos indicadores de risco cardiovascular com o aumento do IMC, considerando a existência de uma evolução não linear, mais precisamente em formato de "U", com o aumento de peso. Neste caso, o excesso de peso sugeriria um efeito protector para estes aspectos da fisiologia cutânea^[10].

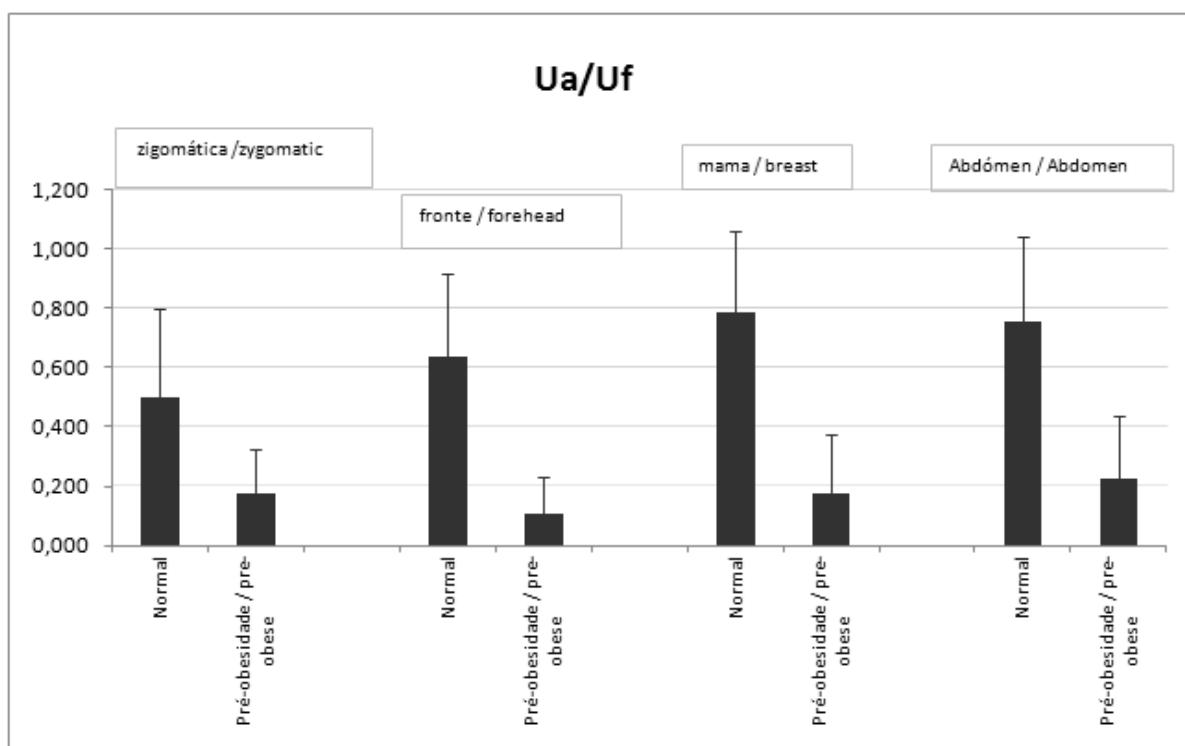


Figure 3 - Total elasticity, including the distensions and recovery pulses by anatomical area ($\alpha < 0,05$)
Figura 3 - Elasticidade Total, incluindo o pulso de distensão e de recuperação (Ua/Uf), por zona anatómica ($\alpha < 0,05$)

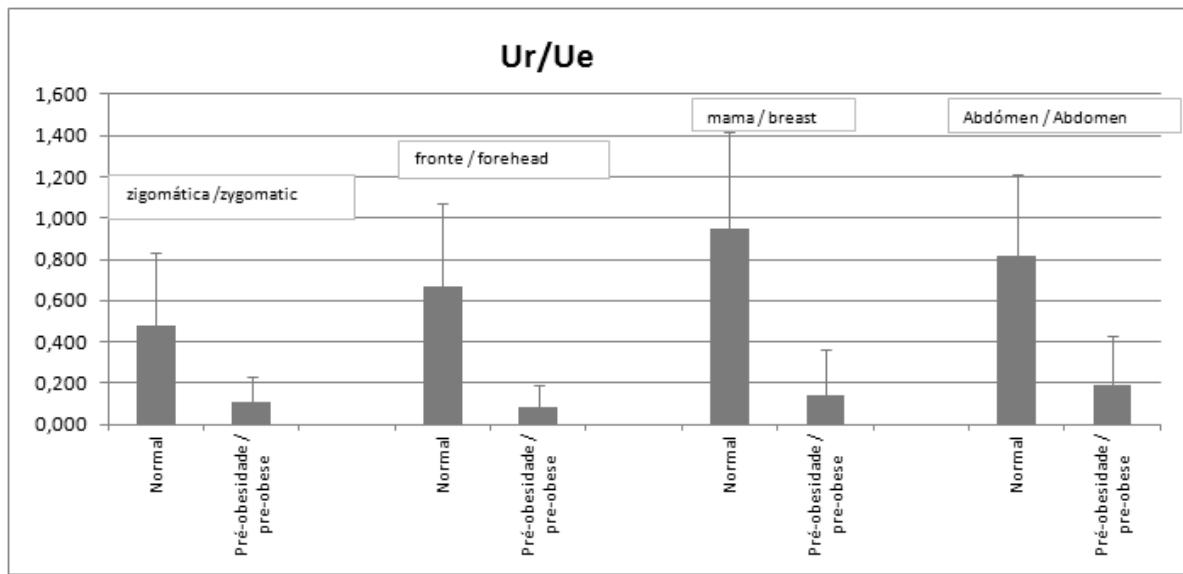


Figure 4 - Elastic index(Ur/UE), by anatomical area ($\alpha < 0,05$)
Figura 4 - Função elástica(Ur/Ue), por zona anatómica ($\alpha < 0,05$)

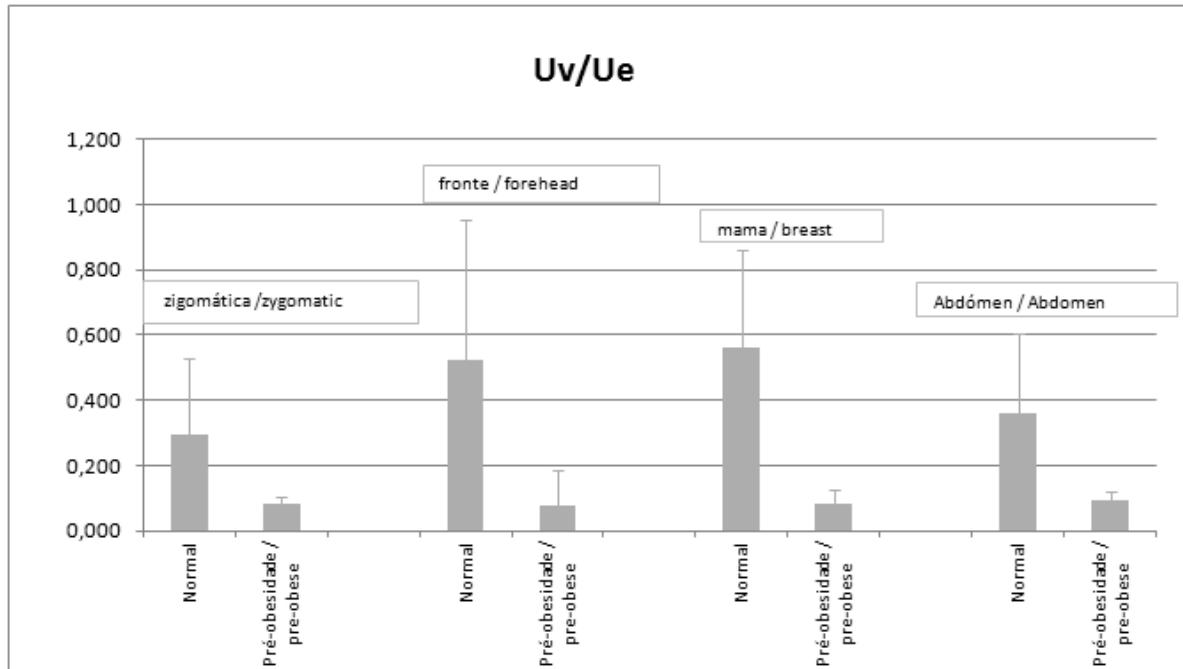


Figure 5 - Viscoelastic ratio, by anatomical area ($\alpha < 0,05$).
Figura 5 - Rácio Visco-elástico, por zona anatómica ($\alpha < 0,05$).

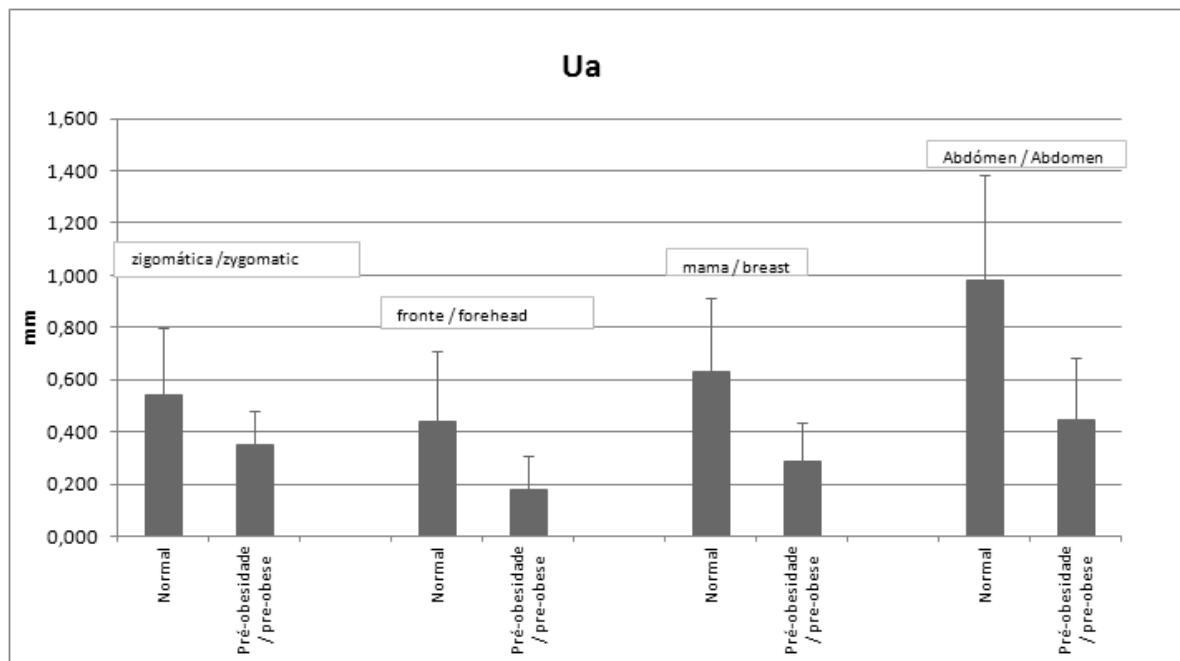


Figure 6 - Skin total recovery (Ua), by anatomical area ($\alpha < 0,05$).

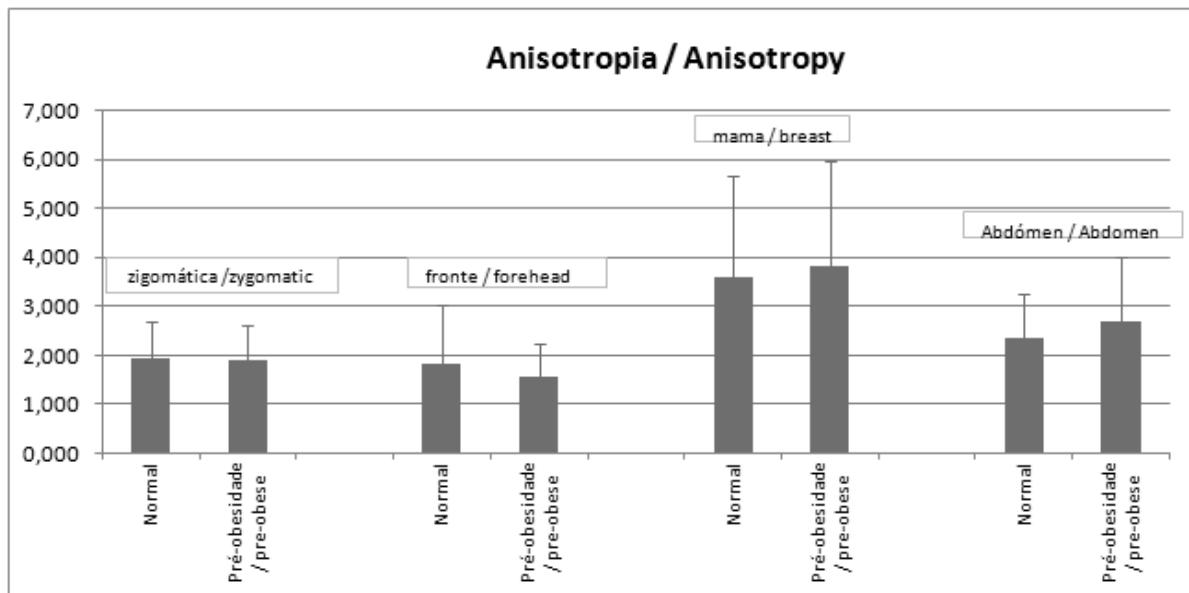
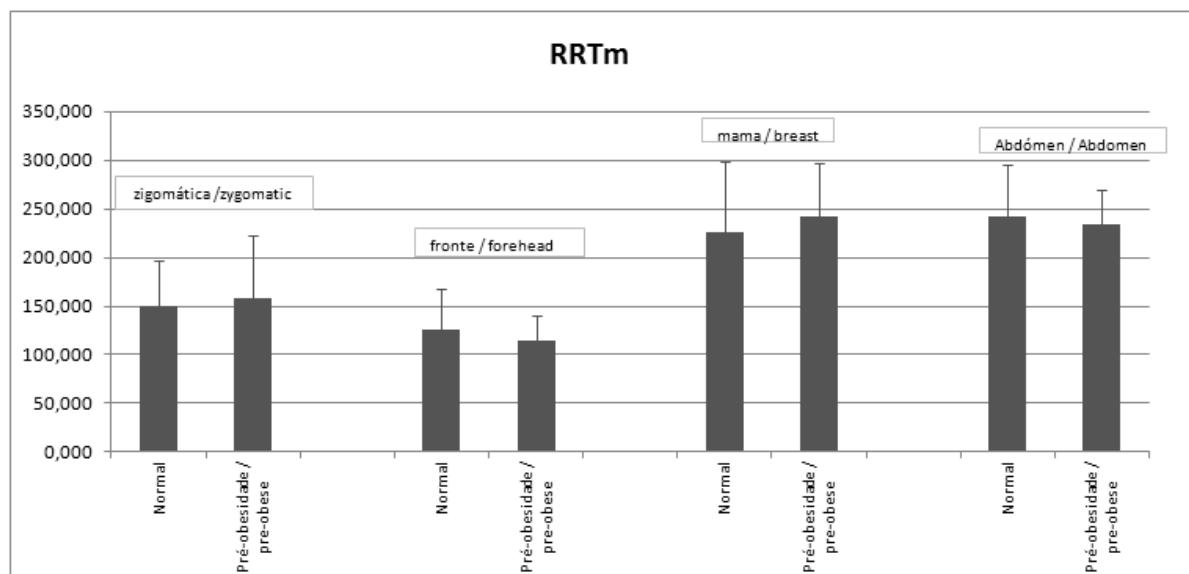
Figura 6 - Recuperação total da pele (Ua) por zona anatómica ($\alpha < 0,05$).

Figures 3 to 8 summarize data regarding skin biomechanical behaviour. Figure 3 represents the analysis of the total elasticity of the skin including the pulse distension (Uf) and recovery (Ua), and its value is close to "1" when the skin has a good capability of distension and a total recovery after suction. Figure 4 represents the elastic function with measurement values showing skin distension and recovery ability after a suction pulse, varying in the same way as mentioned above. In turn, figure 5 shows the viscoelasticity ratio, i.e. the viscoelastic properties of the skin, represented here by the ratio between the value of delayed distension (Uv) and immediate distension (Ue). The skin will have better viscoelastic properties, with an increase in the ratio^[20-22]. Skin biomechanical behaviour in terms of elasticity and viscoelasticity (Figures 3 to 6) is positive for normal weight subjects in all anatomic areas. Nevertheless, statistically significant differences were observed, especially in the forehead, breast and abdomen (Figures 3 to 5). In other anatomical locations there are no statistically significant results and the positive tendency is maintained in normal weight individuals. These results were expected, meaning that weight increase could lead to adverse changes in the skin biomechanical behaviour, as it does during the aging process. Regarding skin biomechanical behaviour, we did not observe any kind of paradox.

As figuras 3-8 representam indicadores do comportamento biomecânico da pele. A figura 3, representa a análise da elasticidade total da pele incluindo o pulso de distensão (Uf) e de recuperação (Ua), e o seu valor aproxima-se de "1" quando a pele tem uma boa capacidade de distensão total e de recuperação total após a mesma. A figura 4 representa a função elástica, com medição dos valores de distensão e retração imediata da pele, variando no mesmo sentido que o referido anteriormente. Por sua vez, o figura 5 representa a relação viscoelástica, i.e., as propriedades viscoelásticas da pele, representadas aqui pela relação entre o valor da distensão retardada (Uv) e imediata (Ue). A pele terá melhores características viscoelásticas, com o aumento do valor da relação^[20-22].

Analizando as figuras 3-6, podemos observar, que o comportamento biomecânico em termos de elasticidade e viscoelasticidade é superior nos indivíduos normoponderais em todas as áreas anatômicas consideradas. Aqui, podemos já verificar também diferenças estatisticamente significativas, nomeadamente na fronte, mama e abdómen (figura 3 a 5). Nas restantes zonas anatômicas, embora não se observem resultados com significado estatístico, a tendência é mantida, sendo positiva para os normoponderais.

Estes resultados estão de acordo com o esperável, uma vez que seria esperado que o aumento de peso pudesse levar a alterações negativas no comportamento biomecânico da pele, tal como acontece durante o processo de envelhecimento^[23]. Aqui não se verifica qualquer paradoxo no que diz respeito ao comportamento biomecânico da pele.

**Figure 7** - Anisotropy by anatomical area ($\alpha < 0,05$).**Figura 7** - Anisotropia, por zona anatómica ($\alpha < 0,05$).**Figure 8** - Ressonance Running Time médium, by anatomical area ($\alpha < 0,05$).**Figura 8** - Ressonance Running Time médio, por zona anatómica ($\alpha < 0,05$).

Anisotropy and RRTm (Figures 7 and 8) values have shown no tendency variation related to BMI.

Os valores da Anisotropia e RRT médio (figuras 7 e 8), não permitiram observar qualquer linha de tendência na variação das variáveis em função do IMC nem diferenças com significado estatístico.

Conclusion

This study has illustrated the influence of BMI changes on the biomechanical behaviour and hydration of skin. Furthermore, the BMI increase in the class below the classification of individuals as "obese", e.g. the overweight class, might have a positive influence on skin hydration and barrier function parameters. This trend suggests an eventual protective effect of weight gain on the physiology of the skin, an effect already reported in previous studies for other physiological markers^[10]. Moreover, regarding the biomechanical markers, a negative correlation with weight gain, i.e. a negative tendency, was observed with significant differences in different anatomical areas. In any case, further studies are needed to investigate these tendencies in a more representative universe.

Conclusão

Este estudo permitiu ilustrar a influência da alteração de IMC no comportamento biomecânico e na hidratação da pele. Por outro lado, foi possível verificar também que o aumento do IMC para valores inferiores à classificação dos indivíduos como "obesos", poderá ter uma influência positiva na variação dos parâmetros de hidratação e função barreira. Esta tendência, sugere um possível efeito protetor do aumento de peso sobre a fisiologia cutânea, efeito este já referido em estudos anteriores para outros indicadores fisiológicos^[10]. Por outro lado, verifica-se uma linha de tendência de evolução negativa no que diz respeito aos indicadores biomecânicos, com diferenças significativas em várias áreas anatômicas. Em qualquer caso, os resultados aqui adiantados precisam de ser aprofundados em universos mais representativos.

Conflict of interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that can be understood as representing a potential conflict of interest.

Conflito de Interesses

Os autores declaram a inexistência de qualquer tipo de relação financeira ou pessoal que possa representar um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- [1] Wang Y, Kumanyika S, Descriptive Epidemiology of Obesity in the United States, in Hanbook of obesity prevention – a resource for health professionals, Springer science + Business Media, LLC, USA, 2007, 3: 45-71
- [2] Ogden C, Yanovski S, Carroll M, Flegal K, The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterology* 2007;132:2087-2102
- [3] Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of obesity in the United States, 2009–2010. *NCHS data brief*, no 82. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2012.
- [4] WHO Europe: Facts and figures, in <http://www.euro.who.int> de Junho de 2012
- [5] Do Carmo I, Santos O, Camolas J, Vieira J, Carreira M, Medina L, Reis L, Myatt J, Galvão-Teles A, Overweight and Obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obesity Reviews* (2008) 9, 11-19
- [6] Sardinha L, Santos D, Silva A, Coelho-e-Silva, Raimundo A, Moreira H, Santos R, Vale S, Baptista F, Mota J, Prevalence of overweight, Obesity, and abdominal obesity in a representative sample of portuguese adults. *PLoS ONE* (2012) 7(10):e47883. Doi:10.1371/journal.pone.0047883
- [7] Yosipovich G, De Vore A, Dawn A. Obesity and skin: Skin physiology and skin manifestations of Obesity. *J Am Acad Dermatol*, 2007;6: 901-16
- [8] Nino M, Franzese A, Ruggiero Perrino N, Balato N. The Effect of Obesity on Skin Disease and Epidermal Permeability Barrier Status in Children. *Pediatr Dermatol*. 2012 Apr 4.
- [9] Guida B, Nino M, Perrino NR, Laccetti R, Trio R, Labella S, Balato N, The impact of obesity on skin disease and epidermal permeability barrier status. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Feb;24(2):191-195.
- [10] Kastorini C, Panagiotakos D, The Obesity Paradox: Methodological considerations based on epidemiological and clinical evidence – New insights. *Maturitas* 72 (2012) 220-224.
- [11] WHO, Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 854. Geneva: World Health Organization, 1995
- [12] República, Lei 46/2004 de 19 de Agosto.
- [13] EUROPEAN DIRECTIVE 2001/20/EC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member State relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use, Off J Europ Communities, L121/34-44, 2001.
- [14] Note for Guidance on Good Clinical Practice, ICH E6GCP96, EMEA, 2002: 1-55.
- [15] World Medical Association declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human subjects, amended until 2004.
- [16] WHO, Obesity: preventing and managing the global epidemic Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000
- [17] Garrow JS, Welster J. Quetelet's index (W/H2) as a measure of fatness. *Int J Obes* 1985; 9: 147–153.
- [18] Rogiers V; EEMCO Group. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001;14(2):117-28.
- [19] Piérard GE, EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 1: relevance to the structures and ageing of the skin and subcutaneous tissues. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 1999;12(6):352-62
- [20] Seidenari S, Giusti F, Pellacani G, Non-Invasive Methods and Assessment of skin diseases. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006:37-46
- [21] Rodrigues L; EEMCO, EEMCO guidance to the in vivo assessment of tensile functional properties of the skin. Part 2: instrumentation and test modes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001;14(1):52-67.
- [22] Darlenski R, Sassing S, Tsankov N, Fluh JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm and Biopharm*. 2009, 72:295-303
- [23] Ruvolo EC, Stamatas GN, Kollias N. Skin Viscoelasticity displays site and age-dependent angular anisotropy. *Skin Pharmacol Physiol*, 2007, 20: 313-321