

High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) may be used to characterize obese skin

*Ressonância Magnética Espectroscópica de Rotação do Ângulo Mágico (HRMAS) como
instrumento de caracterização de doentes obesos*

Liliana Tavares¹, M^a Angélica Almeida², M^a Julia Bujan³ & L. Monteiro Rodrigues¹

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

² Plastic & Reconstructive Surgery Direction, HSJ-CHLO, Lisboa, Portugal

³ Faculty of Medicine, Universidad de Alcalá, Henares, Madrid, Spain

E-mail: monteirodurigues.dcs@ulusofona.pt

Abstract

Obesity is a growing problem worldwide and has many connections to other co-morbidities. New technological developments such as Magic Angle Spinning (HR MAS) - NMR may help to accelerate our knowledge regarding complex material such as the skin. In the present paper, the authors applied ¹H HRMAS NMR to study obese skin and define its metabolic profile. Skin samples from the breast and abdominal regions of 5 obese and 5 normal patients were compared using this spectroscopic technique. Although preliminary, results suggest that differences between normal and obese lipidic profiles exist. These differences particularly occur in the unsaturation level, which in the present conditions seems to be notably reduced in obese abdominal samples. ¹H HRMAS appears to provide helpful information to better characterize this pathology.

Keywords: obesity; RMI; HRMAS; cutaneous characterisation; ex vivo.

Resumo

A Obesidade é um problema em franco crescimento por todo o globo, com muitas relações com outras co-morbididades. Novos desenvolvimentos tecnológicos como a Ressonância Magnética Espectroscópica de Rotação do Ângulo Mágico (HRMAS) podem ajudar a acelerar o nosso conhecimento deste complexo e principal tecido - a pele obesa. No presente trabalho os autores aplicaram a técnica de ressonância designada por ¹H HRMAS NMR para estudar a pele de doentes obesos e assim contribuir para definir o seu perfil metabólico. Foram obtidas amostras de pele das regiões mamária e abdominal de 5 doentes obesos e comparadas com idênticas amostras obtidas de 5 pacientes normais. Os resultados, embora preliminares, sugerem a existência de diferenças entre os perfis lipídicos dos doentes obesos e dos pacientes normais, a nível da insaturação, especialmente reduzida nas amostras de abdómen da pele obesa. Assim, a ¹H HRMAS parece proporcionar um interessante meio adicional para melhor caracterizar esta patologia.

Palavras-chave: obesidade; RMI; HRMAS; caracterização cutânea; ex vivo.

Introduction

Obesity is a serious growing problem all over the world, with prevalence in Europe and the USA where it reaches 20 - 30% in adulthood^[1]. This dramatic global increase in obesity which began in the 80's, has led to the disease being considered an epidemic and therefore a genuine public health problem. Many associations with other co-morbidities such as hypertension, coronary disease, dyslipidemia, diabetes and sleep apnea, are already known^[1-4].

The impact of obesity on these patient's skin has been an interesting issue for many research groups, especially over the last few years.^[1-9] This is because obesity has been linked to many physiological changes, including "barrier", circulation and appendices modification.^[4,7] Obesity compromises the lymphatic flow which alters collagen synthesis and wound repair^[4]. In addition, the cytokines production balance by adipocytes seems to be altered even after weight loss.^[8,9] However, the process's pathophysiology remains poorly known.

New technologies have allowed us new and different insights into these questions. Such is the case with the new Nuclear Magnetic Resonance (NMR) tool which is proving to be valuable in the analysis and characterization of biological materials. It can reveal the composition spectra of tissue extracts / cells which allows for a deeper look into some metabolic processes^[10,11]. Application of NMR to human skin is still insufficient, being almost confined to the analysis of skin water content^[12]. Despite this, NMR is recognised as having the potential to identify the the skin's metababolic profile.^[13]

Among several other related techniques, the one known as Magic Angle Spinning (MAS) seems to be particularly adequate in the study of heterogeneous systems^[10,14,15]. So in the current work, the authors explored the application of ¹H-HRMAS high resolution proton NMR spectra by magic angle rotation to human skin samples obtained from obese and normal patients, with the aim of contributing to define skin's metabolic profile in obesity.

Materials and Methods

Ten female volunteers grouped as Group I, obese n=5 IMC >30, mean age 42 ± 10 y.o., and Group II, non-obese, n=5 IMC <24,9, mean age 36 ± 5 y.o., were accepted for the study after giving their informed written consent. All Helsinki Declaration principles were observed and experimental procedures were submitted in advance to the respective institutional commissions.

Full skin samples were obtained by punch biopsies from the breast and abdomen regions during

Introdução

A obesidade é um problema crescente a nível mundial, com uma prevalência na Europa e Estados Unidos que atinge 20 a 30% da população adulta^[1]. Este aumento dramático e exponencial da doença, registada sobretudo a partir do ano 1980, e a sua extensão global, leva a considerar a obesidade uma epidemia, e como tal, um problema de saúde pública, uma vez que se reconhecem as associações com diversas comorbilidades, tais como a hipertensão arterial, a doença coronária, a dislipidemia, a diabetes melitus e a apneia do sono^[1-4].

O impacto da obesidade na pele destes doentes tem interessado diversos grupos, em especial nos últimos anos^[1-9], já que esta condição se relaciona com inúmeras alterações fisiológicas, incluindo alterações na função "barreira", da circulação e do funcionamento dos anexos^[4,7]. A obesidade compromete o fluxo linfático, o que altera a formação de colagénio e a reparação celular^[4]. O próprio balanço da produção de citocinas por parte dos adipócitos parece estar alterado mesmo nos obesos após perda de peso^[8,9]. Contudo, a sua fisiopatologia é pouco conhecida.

As novas tecnologias têm proporcionado novos e diferentes olhares sobre estas questões. É o caso da ressonância magnética nuclear (NMR) uma ferramenta que se vem revelando como valiosa, no que se refere à análise e caracterização de amostras biológicas, permitindo obter espectros de extractos de tecidos e/ou células, que contribuem para melhor compreender alguns processos metabólicos^[10,11]. Apesar da aplicação do NMR à pele humana ser ainda muito insuficiente, quase limitada a estudos do seu conteúdo hídrico^[12], apresenta um interessante potencial de aplicabilidade na identificação do seu perfil metabólico^[13].

Dentro das diversas técnicas desenvolvidas, a designada por Magic Angle Spinning (MAS) tem-se revelado especialmente versátil no estudo de sistemas heterogéneos^[10,14,15]. Neste sentido, os autores exploraram, no presente trabalho, a aplicação da ressonância magnética espectroscópica de rotação do ângulo mágico (¹H-HRMAS *high resolution proton NMR spectra by magic angle rotation*) a amostras de pele humana obtidas em doentes obesos e em pacientes normais, de forma a contribuir para a definição do perfil metabólico da pele na obesidade.

Materiais e Métodos

O estudo envolveu uma amostra de conveniência, constituída por dez voluntários do sexo feminino, dividida em dois grupos - Grupo I, correspondendo a doentes obesas, n=5, IMC >30, idade média 42 ± 10 anos, e Grupo II, não obesas, n=5 IMC <24,9, idade média 36 ± 5 anos. Todas as voluntárias expressaram,

corrective plastic or aesthetic surgical procedures. Non-obese samples were obtained during pre-scheduled aesthetic surgeries not specifically related to the present study. These two anatomical areas were chosen because they suffer the most dramatic changes during obesity and after weight loss. All samples were obtained from the same anatomical areas in all individuals.

Samples were preserved in a -80°C (liquid nitrogen) atmosphere and properly prepared for ^1H -HRMAS analysis.

1mm tissue was obtained by biopsy procedure. Fat was carefully removed. The tissue was weighed (mean = $0,032 \pm 0,006\text{mg}$) and then transferred into a tarred $20\mu\text{L}$ leak-proof zirconium HR-MAS rotor containing $3,0\mu\text{L}$ of deuterium oxide and $0,75\text{ wt}\%$ sodium-3-trimethylsilylpropionate-2,2,3,3- d_4 ($\text{D}_2\text{O}+\text{TSP}$). The rotor was then assembled and placed into the spectrometer after a handling time of $\sim 3\text{-}4$ min. ^1H HR-MAS spectroscopy was performed using a Burker Avance III spectrometer (400MHz), equipped with a TXI 5 mm probe.

Data was statistically described and a Principal Component Analysis applied.

Results and Discussion

^1H -HRMAS high resolution proton NMR spectra by magic angle rotation seems to be particularly suitable to be applied to solid systems such as *ex vivo* human skin samples, without the usual conditioning factors that limit its use ^[10,12,13,15]. It allows us to quantify metabolites and metabolic processes in each tissue ^[10-15]. NMR sensitivity is limited by the typical non-homogeneity of biological systems, which can be anything from a cell suspension to a cell extract or a tissue sample. This seems to be due to the magnetic field and to anisotropic dipole-dipole interactions ^[13,15,16]. ^1H nuclei are the most common and sensitive and their spectra may be obtained *in situ* as in culture mediums, cell extracts or tissue samples. However, proton anisotropies evoked such wide ^1H NMR spectra that resolution was always compromised. The problem was solved by eliminating the anisotropic dipole interaction by the magic angle rotation over an axis, oriented with $54,74^{\circ}$ regarding the magnetic field. ^[17] This technique, known as Magic Angle Spinning (MAS), was shown to be particularly suitable in its application to heterogeneous systems such as the human skin ^[10,14,15].

^1H -HRMAS allows various resonances of lipids to be observed. Figures 1 and 2 show a clear reduction in the overall unsaturated lipid pool in the breast and abdominal areas, two regions which particularly suffer interference in obese patients. This reduction is associated with a marked decrease in the levels of

por escrito, o seu consentimento informado. Todos os procedimentos e metodologias aplicadas foram previamente submetidos e aprovados pelas Comissões de Ética das referidas instituições, garantindo assim os princípios gerais das boas práticas clínicas aplicáveis aos estudos envolvendo voluntários humanos, e o pleno cumprimento de todas as normas éticas previstas na Declaração de Helsínquia e emendas subsequentes

As amostras de pele total das doentes obesas foram obtidas por biopsia de *punch* a partir das regiões anatómicas da mama e abdómen, durante procedimentos cirúrgicos de cirurgia plástica e/ou estética para correção do contorno corporal. As amostras das pacientes não obesas foram obtidas durante procedimentos de cirurgia estética, não directamente relacionadas com o presente estudo. A escolha das áreas anatómicas foi efectuada tendo em conta as alterações dramáticas observadas nestas áreas, durante a obesidade e, após a perda de peso. Todas as amostras foram obtidas nos mesmos locais anatómicos, em todos os indivíduos.

As amostras foram preservadas a -80°C (nitrogénio líquido) e preparadas de acordo com os procedimentos necessários para uma análise de ^1H -HRMAS.

A partir da biopsia, foi obtido 1mm de pele, removendo toda a gordura adjacente. A amostra foi então pesada (média = $0,032 \pm 0,006\text{mg}$) e transferida para uma célula de zircónio do rotor HRMAS de $20\mu\text{L}$ contendo $3,0\mu\text{L}$ de óxido de deuterium e $0,75\text{ wt}\%$ de sodium-3-trimethylsilylpropionate-2,2,3,3- d_4 ($\text{D}_2\text{O}+\text{TSP}$). O rotor foi então fechado e colocado no espectrómetro após um tempo de manuseamento de aproximadamente 3-4 min. A espectroscopia de ^1H HRMAS foi realizada utilizando um espectrómetro Burker Avance III (400MHz), equipado com uma sonda TXI de 5 mm.

A análise estatística foi baseada na análise de componentes principais.

Resultados e Discussão

Uma das vantagens da ressonância magnética espectroscópica de rotação do ângulo mágico resulta do facto de poder ser aplicada a amostras sólidas, como o caso de amostras de pele *ex vivo*, sem os habituais interferentes que limitariam a sua utilização ^[10,12,13,15], permitindo quantificar os metabolitos e os processos metabólicos próprios de cada tecido ^[10-15]. A sensibilidade do NMR é limitada pela inexistência de homogeneidade nas amostras biológicas (que podem ir desde uma suspensão de células, a um estrato celular ou a uma amostra de tecido), pelas variações no campo magnético e interacções anisotrópicas dipolo-dipolo. ^[13,15,16] Os núcleos ^1H são os mais comuns e mais sensíveis, e os seus espectros podem ser obtidos *in situ*, por exemplo em meios de cultura, extractos celulares ou amostras de tecidos. Contudo, as anisotropias dos prótons originavam um espectro tão largo de ^1H NMR que não era possível obter uma boa resolução em nenhuma linha do mesmo. Esta situação foi alterada

other metabolites such as CH_3 (L1) , CH_2 (L2), $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ (L3) , $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$ (L4) , CH_2CO (L5) , $\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH}$ (L6) and CH=CH (L7).

mais tarde quando se conseguiu demonstrar que as interações dipolares anisotrópicas podiam ser eliminadas introduzindo uma alteração que consistia na rotação da amostra sobre um eixo, orientada a $54,74^\circ$ em relação ao campo magnético^[17]. Esta técnica, conhecida como Magic Angle Spinning(MAS) tornou-se, dentro da NMR, extremamente versátil no estudo de sistemas heterogêneos^[10,14,15], parecendo ser particularmente adequada na definição do perfil metabólico da pele .

A ^1H -HRMAS permitiu a visualização de várias frequências de lípidos. Nas figuras 1 e 2, podem ser observadas duas das áreas mais intervencionadas nestes pacientes, a mama e o abdómen, regiões onde existe uma clara redução na quantidade total de lípidos insaturados. Esta redução está associada a uma marcada redução nos níveis de outros metabolitos, tais como CH_3 (L1) , CH_2 (L2), $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ (L3) , $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$ (L4) , CH_2CO (L5) , $\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH}$ (L6) e CH=CH (L7).

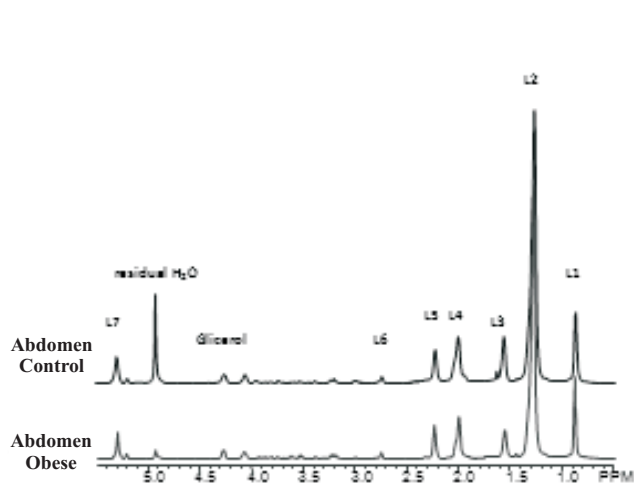


Figure 1 - Representative ^1H -HRMAS profiles from abdominal samples (control and obese).

Figura 1 - Representação dos perfis ^1H -HRMAS obtidas das amostras da região abdominal (controle e obesos)

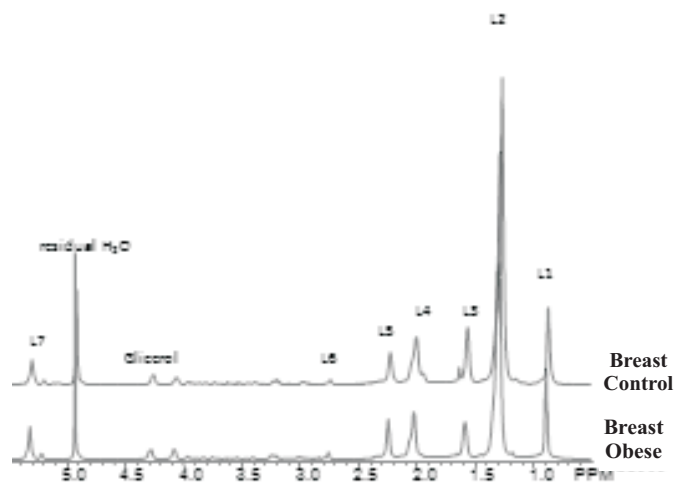


Figure 2 - Representative ^1H -HRMAS profiles from breast samples (control and obese).

Figura 2 - Representação dos perfis ^1H -HRMAS obtidas das amostras da região mamária (controle e obesos)

From the Principal Component Analysis of ^1H -HRMAS, in the abdomen skin samples (control and obese) it is shown that PC1 and PC2 comprises 99% of the total variance, and a clear trend can be noticed on the loadings plot, separating control from obese (Figure 3A). A 3D representation of this PCA of ^1H -HRMAS from abdominal skin samples helps to confirm a clear separation between groups, in spite of some group proximity (Figure 3B).

A partir da Análise de Componentes Principais do ^1H -HRMAS, foi demonstrado que o PC1 e o PC2 compreende, nas amostras de pele do abdomen (controle e obesas) 99% da variância total, e uma clara tendência na separação de cargas entre o grupo de obesos e o controle (Figura 3A). Uma representação tridimensional deste PCA ^1H -HRMAS das amostras de pele do abdomen, confirma a clara separação entre os grupos, apesar de haver alguma proximidade entre os mesmos. (Figura 3B).

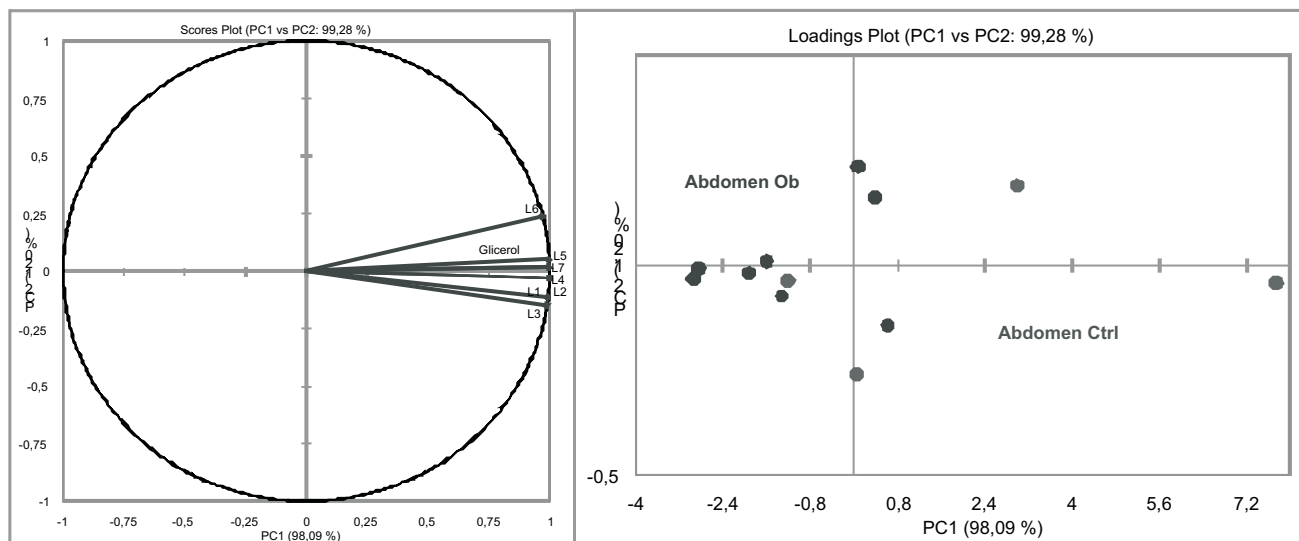


Figure 3A - Principal Component Analysis of 1H-HRMAS from abdomen skin samples (control and obese). A trend can be noticed on the loadings plot, separating control from obese.

Figura 3A - Análise de Componentes Principais de 1H-HRMAS de amostras da região abdominal (control e obesos). Uma tendência de separação entre os dados de controle e os dados dos doentes obesos é aparente.

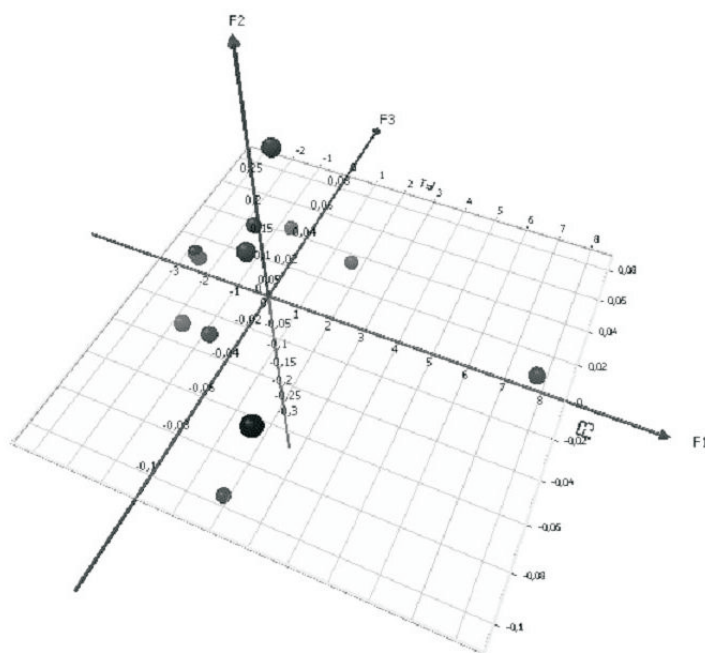


Figure 3B - 3D representation of Principal Component Analysis of 1H-HRMAS from abdominal skin samples (control in black and obese in grey).

Figura 3B - Representação 3D da Análise de Componentes Principais de 1H-HRMAS de amostras da região abdominal (control a preto e obesos a cinzento).

The same analysis performed on the breast skin samples from control and obese patients also shows that PC1 and PC2 comprises 99% of the total variance, and a clear separation between the control from an obese groups due to higher levels of L3 and L4 and lower L6 in the control group (Figure 4A). The respective 3D representation of these samples also helps to confirm the differences between the groups. (Figure 4B)

A mesma análise efectuada na pele da mama, comparando os dois grupos, mostrou que o PC1 e o PC2 abrangem 99% da variância, e uma clara separação entre os grupos I e II, tendo obtido níveis mais elevados de L3 e L4 e a níveis inferiores de L6 no grupo controlo (Figura 4A). A respectiva representação tridimensional das amostras permite confirmar estas diferenças entre os grupos (Figura 4B)

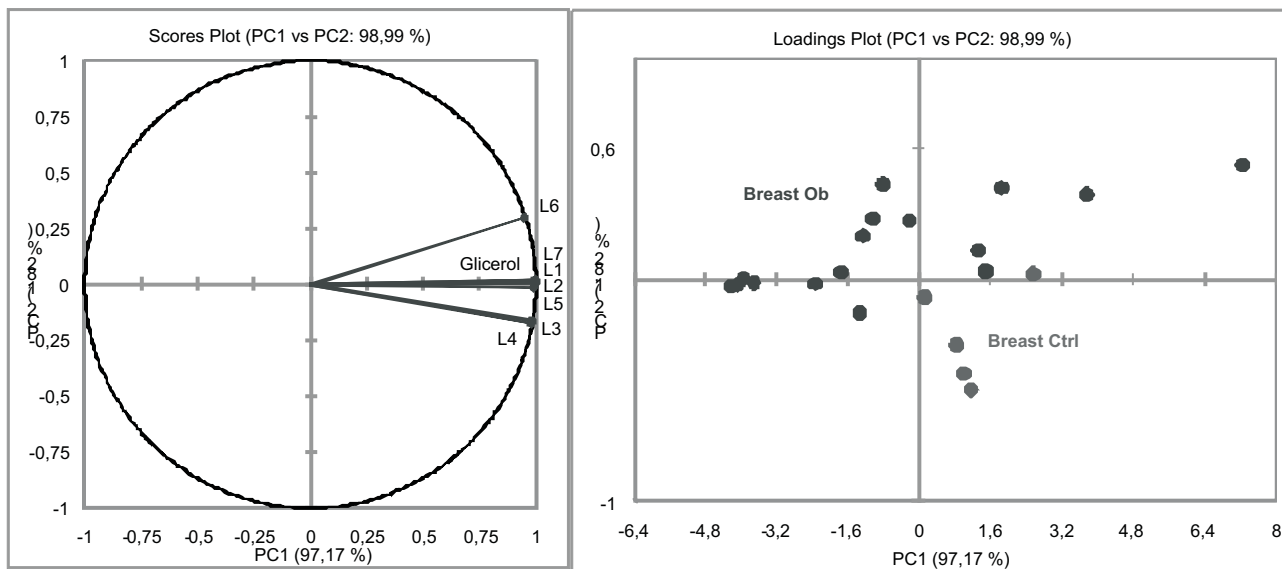


Figure 4A - Principal Component Analysis of 1H-HRMAS from breast skin samples (control and obese. A clear separation between control and obese is shown (see text)

Figura 4A- Análise de Componentes Principais de 1H-HRMAS de amostras da região mamária (control e obesos). Uma tendência de separação entre os dados de controle e os dados dos doentes obesos é aparente.

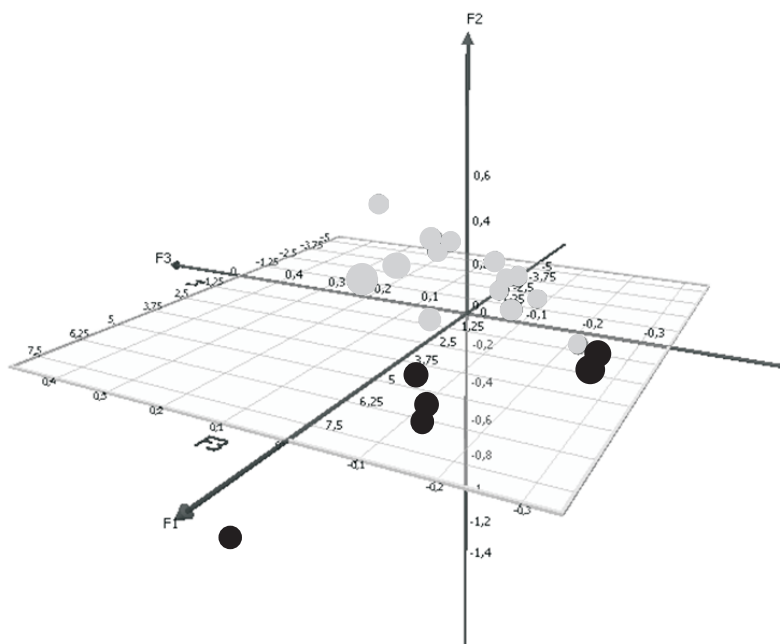


Figure 4B - 3D representation of Principal Component Analysis of 1H-HRMAS from breast skin samples (control in black and obese in grey)

Figura 4B - Representação 3D da Análise de Componentes Principais de 1H-HRMAS de amostras da região mamária (control a preto e obesos a cinzento).

In conclusion, this NMR specific technique has been successfully used to identify different tissue metabolite indicators for obese patients in relation to normal control samples in the present experimental conditions. Several differences between normal and obese lipidic profiles were detected, particularly in the insaturation level, which was especially reduced in obese abdominal samples.

Através deste estudo, podemos concluir que, nas presentes condições experimentais, esta técnica de NMR tem demonstrado uma boa eficácia na identificação de indicadores metabólicos em pacientes obesos, quando comparados com pacientes não obesos. Foram detectadas diferenças entre os perfis lipídicos dos dois grupos, particularmente ao nível dos lípidos insaturados, os quais estão claramente diminuídos nos

¹H-HRMAS seems to provide new insights into skin metabolism including in obesity and may help to understand the complex cutaneous pathophysiology associated with this disease.

Acknowledgments

To Dr Paulo Neves from the Hospital N^a Sr^a da Graça CHMT, Tomar, Portugal

To the Nuclear Magnetic Resonance Laboratory of the Coimbra Chemistry Centre - Universidade de Coimbra (www.nmrccc.uc.pt) where the NMR data were obtained (this activity is supported in part by the grant REEQ/481/QUI/2006 from FCT, POCI-2010 and FEDER, Portugal)

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.

obesos, especialmente na zona anatómica do abdómen. Como tal, o ¹H-HRMAS permite uma nova abordagem do metabolismo da pele na obesidade e pode ser uma importante ajuda na compreensão da complexa fisiopatologia cutânea associada a esta doença.

Agradecimentos

Ao Dr. Paulo Neves, Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital N^a Sr^a da Graça CHMT, Tomar, Portugal.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Química de Coimbra – Universidade de Coimbra (www.nmrccc.uc.pt) onde foram obtidos os dados de RMN (esta actividade é apoiada pelo programa REEQ/481/QUI/2006 da FCT, POCI-2010 e FEDER, Portugal).

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- [1] Berghofer, A., Pischon, T., Reinhold, T., Apovian, C.M., Sharma, A.M., Willich, S.N., 2008. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 8, 200.
- [2] Formiguera X, Canón A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18 (2004) 6: 1125–1146.
- [3] Camões M, Lopes C, Oliveira A, Santos AC, Barros H. Overall and central obesity incidence in an urban Portuguese population. *Preventive Medicine* 50 (2010) 50–55.
- [4] Yosipovich G, De Vore A, Dawn A. Obesity and skin: Skin physiology and skin manifestations of Obesity. *J Am Acad Dermatol* 6 (2007) 901-16.
- [5] Blümich B, Perlo J, Casanova F. Mobile single-sided NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 52 (2008) 197-269.
- [6] Cartigny B, Azaroual N, Imbenotte M, Mathieu D, Parmentier E, Vermeersch G, Lhermitte M. Quantitative determination of glyphosate in human serum by ¹H NMR spectroscopy. *Talanta* 74 (2008) 1075-1078.
- [7] Sikaris KA. The Clinical Biochemistry of Obesity – More than Skin Deep. *Heart, Lung and Circulation* 2007;16:S45-S50.
- [8] Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R., Adipocytokinas – novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol*, 2006; 57: 505-28.
- [9] Shienfeld NS. Obesity and Dermatology. *Clin dermatol*, 2004; 22: 303-9.
- [10] Grivet JP, Delort AM, NMR for microbiology: In vivo and in situ applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (2009) 1-53.
- [11] Avni R, Mangoubi O, Bhattacharyya R, Degani H, Frydman L, Magnetization transfer magic-angle-spinning z-spectroscopy of excised tissues. *J Magn Reson* 199 (2009) 1-9.
- [12] Blümich B, Perlo J, Casanova F, Mobile single-sided NMR. . *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 52 (2008) 197-269.
- [13] Chen JH, Singer S, High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy, In: Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E, Handbook of Metabonomics and Metabolomics, 2007, Elsevier B.V.
- [14] Piotto M, Elbayed K, Wieruszkeski JM, Lippens G, Practical aspects of shimming a high resolution magic angle spinning probe. . *J Magn Reson* 173 (2005) 84-89.
- [15] Grivet JP, Delort AM, Portrais JC, NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie* 85(2003)823-840.
- [16] Schurko RW, Introduction to solid state NMR . In : <http://mutuslab.cs.uwindsor.ca/schurko/ssnmr/index.html>, Access in July 2011.
- [17] Cheng LL, Lean CL, Bogdanova A et al, Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson Med* 36 (1996) 653-8.

