

Cutiscan® - A new system of biomechanical evaluation of the skin *in vivo* - comparative study of use depending on the anatomical site

Cutiscan® - Um novo sistema de avaliação biomecânica da pele in vivo - estudo comparativo de utilização em função do local anatómico

Catarina Rosado¹, Filipa Antunes², Raquel Barbosa¹, Raquel Fernando¹ and L. Monteiro Rodrigues^{1,2}

¹CBIO - Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies (UDE), Campo Grande, 376, 1749-024, Lisboa, Portugal

²Pharmacol. Sc Depart - Universidade de Lisboa, School of Pharmacy, Lisboa, Portugal

Email: catarina.rosado@ulusofona.pt

Abstract

Skin is a complex biomaterial. One of its characteristics is anisotropy due to fiber alignment, resulting from prolonged exposure to a surrounding stress state. This property is important in experimental studies of skin biomechanics and in experimental dermatology.

During the last decades, several devices have been developed to study the cutaneous physiology. The CutiScan®, one of the latest, provides information not only about the elastic and viscoelastic properties, but also on anisotropy and directionality of the skin.

The aim of this study is to investigate the changes in the biomechanical properties of human skin due to the anatomical site, combined with a study on the benefits and limitations of the CutiScan®, and also comparing it with other more studied devices - the Cutometer® and the Reviscometer®.

20 volunteers were engaged in this investigation after an informed consent. Measurements were conducted in three different anatomical sites (forehead, forearm and leg) with each device.

Results showed that devices were able to identify significant differences among anatomical sites. The CutiScan® enabled a more complete assessment of skin's biomechanical properties, since it provides real-time images and 360° elasticity curves that allowed the simultaneous study of viscoelasticity and anisotropy.

Keywords: Skin biomechanics, anisotropy, elasticity, anatomical differences, CutiScan®.

Resumo

A pele é um biomaterial complexo. Uma das suas características é anisotropia, devido ao alinhamento das fibras, decorrente da exposição prolongada a estados de tensão na pele. É importante para os estudos experimentais no campo da biomecânica cutânea e da dermatologia experimental.

Nas últimas décadas, surgiram vários equipamentos para estudar a fisiologia cutânea. O CutiScan®, um dos mais recentes, fornece informações tanto sobre as propriedades elásticas e viscoelásticas, como sobre a anisotropia e direccionalidade da pele.

O objetivo deste trabalho foi analisar as alterações nas variáveis biomecânicas da pele humana em função da região anatómica, combinando com o estudo das oportunidades e limitações do CutiScan®, comparando com outros equipamentos mais estudados - o Cutometer® e o Reviscometer®.

20 voluntários participaram neste estudo, após consentimento informado. Foram realizadas medições em três locais anatómicos diferentes (fronte, antebraço e perna) com os diferentes aparelhos.

Os resultados mostraram que os equipamentos permitiram identificar diferenças significativas entre as regiões anatómicas. O CutiScan® permitiu uma avaliação mais completa do comportamento biomecânico da pele, fornecendo imagens em tempo real e curvas de elasticidade 360°, e permitindo estudar simultaneamente a viscoelasticidade e a anisotropia.

Palavras-Chave: Biomecânica da pele, anisotropia, elasticidade, diferenças anatómicas, CutiScan®

Received / Recebido: 25/03/2015

Accepted / Aceite: 06/05/2015

Electronic Edition: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>

Introduction

Several studies have widely demonstrated that the skin properties change with age, anatomical site, animal (including human), skin type, etc. [1,2,3,4]. In order to study these differences, several methods have been developed for the biomechanical characterization of human skin, useful in research and experimental studies in the dermatology area [2,3,4].

As the skin is a material with a complex composition and organization, its properties are affected both by the characteristics of the tissue and associated structures, such as extrinsic factors [4,5]. The changes observed in the skin reflect internal forces that resist deformation, caused by the forces established between atoms and molecules. These can be different in diverse anatomical sites, due to both genetic factors and external alterations [4].

Extrinsic factors, particularly environmental issues, have an important role in different skin characteristics. Solar radiation can cause many variations in dermal tissue, specifically in the elastic fibers and in collagen cross links [1,2].

One of the characteristics of human skin is anisotropy, due to preferred skin fiber alignment, which is affected by tension forces. Anisotropy is the property of a material which is directionally dependent. The skin anisotropic characterization is a good method to evaluate the changes in its biomechanical properties, thus it is an important variable in research [2,3].

The aim of this study was to compare the changes in the biomechanical properties of human skin (viscoelasticity and anisotropy) depending on the anatomical site, using widely known devices and a device utilising a new measuring approach - the CutiScan® CS 100 - which associates the application of mechanical suction force with video images of skin displacement in real time [6-7].

Materials and Methods

For this investigation, a sample of 20 healthy female volunteers aged between 19 and 73 (37 ± 18.7) years old was selected. These volunteers were subjected to measurements after informed consent, and all procedures were conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki and its respective amendments [8].

Inclusion conditions in the study were being female and Caucasian. Non-inclusion criteria were a possible

Introdução

Tem sido largamente demonstrado em diversos estudos que as propriedades da pele variam com a idade, a região anatómica, a raça, o tipo de pele, entre outros [1,2,3,4]. A fim de estudar estas diferenças, têm sido desenvolvidas várias metodologias para a caracterização biomecânica da pele humana, úteis em investigação e em estudos experimentais no campo da dermatologia experimental [2,3,4].

Sendo a pele um material de composição e organização complexas, as suas propriedades são afetadas tanto pelas próprias características do tecido e estruturas anexas, como por fatores extrínsecos [4,5]. As alterações observadas na pele refletem forças internas que resistem à deformação e são causadas pelas forças estabelecidas entre átomos e moléculas. Estas podem ser diferentes nas várias regiões anatómicas, devido tanto a fatores genéticos, como a alterações externas [4].

Os fatores extrínsecos, principalmente os ambientais, desempenham um papel importante nas diferentes características da pele. A radiação solar pode provocar várias alterações no tecido conjuntivo dérmico, nas fibras elásticas e nas ligações cruzadas de colagénio [1,2].

Uma das características da pele humana é a anisotropia, devido ao alinhamento preferencial das fibras na pele e que é influenciada por forças de tensão. A anisotropia é a propriedade de um material ser direccionalmente dependente. A caracterização anisotrópica da pele é um bom método para avaliar as referidas alterações das propriedades biomecânicas da pele, sendo por isso uma variável importante em investigação [2,3].

Este estudo teve como objectivo comparar as alterações nas variáveis biomecânicas da pele humana (anisotropia e viscoelasticidade) em função da região anatómica, utilizando sistemas largamente conhecidos e uma nova abordagem de medição - o CutiScan® CS 100 - que combina a aplicação de força mecânica de sucção com imagens em vídeo do deslocamento da pele em tempo real [6,7].

Materiais e Métodos

Para o estudo foi selecionada uma amostra de 20 voluntárias, do sexo feminino, saudáveis, com idades compreendidas entre os 19 e os 73 anos ($37 \pm 18,7$ anos de idade). As voluntárias foram submetidas às medições após consentimento informado e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e respetivas emendas [8].

Foram condições de inclusão no estudo serem indivíduos do sexo feminino e caucasóides. Foram consi-

pregnancy or lactation, manifestation of some relevant chronic disease and/or taking regular medication, presence of cutaneous signs in the experimental area, the existence of any type of topical treatment in the eight days preceding the study, and prolonged exposure to UV radiation. Additionally, some restrictions were imposed on volunteers, including prohibition of application of topical products (such as creams, makeup and others) in the areas to be analysed for at least 48 hours preceding the measurements.

All measurements were carried out under constant environmental conditions (20-22°C and 40-60% relative humidity) and according to previously published methods and recommendations [9].

The “envelope” function of the skin was assessed by the Cutometer® MPA580, Reviscometer® RV600 and Cutiscan® CS 100 systems, from CK Electronics (Cologne, Germany); used for enabling non-invasive approaches, and consistent and diverse evaluation of skin biomechanics and because the variables obtained are representative [4,9,10].

Regarding the Cutometer® and the CutiScan® devices, a time/strain measurement mode was used, using a suction cycle with a constant pressure of 400 mbar for about 3 seconds, followed by a relaxation period of about 3 seconds [4,10].

Considering the Cutometer®, the chosen descriptors were - U_f (maximum distension of the skin) and U_a (maximum recovery strain after the deformation period), expressed in mm and U_r/U_e (elastic function) and U_v/U_e (viscoelasticity index), expressed in %. For the Reviscometer® system, the RRT (Resonance Running Time) was selected, measured in the angles 0°, 45°, 90° and 135° (expressed in AU - arbitrary units). For the Cutiscan® the descriptor V3 was chosen, the ratio of V2 and V1 in % (formula: $V2 \times 100 / V1$), which represents the relationship between the returning rate during the relaxation time (V2) and the maximum displacement during the suction time (V1) measured in the angles 0°, 45°, 90° and 135°, and related to the skin viscoelasticity and the anisotropy [6,7].

Measurements were made once for each volunteer in three anatomical areas: the forehead; the internal anterior face of the leg; and the volar forearm, all representing areas with different intrinsic characteristics and change factors.

A specific (body) position of the volunteer and the probes was defined and stamped to ensure the uniformity of the measurements.

Statistical analysis (descriptive and comparative) was performed through SPSS software (v 21.0, IBM, New York, USA). A non-parametric analysis was performed by applying the Mann Whitney U test in or-

derados como critérios de não-inclusão uma eventual gravidez e/ou aleitamento, a manifestação de alguma doença crônica relevante e/ou toma de medicação regular, a presença de sinais cutâneos na área experimental, a existência de qualquer tipo de tratamento tópico nos oito dias anteriores ao estudo e, a exposição prolongada a radiação UV. Adicionalmente foram impostas algumas restrições aos voluntários, nomeadamente a não aplicação de produtos tópicos, tais como cremes, maquiagem, entre outros, nas zonas a analisar durante, pelo menos, 48h antes da realização das medições.

Todas as medições foram realizadas sob condições ambientais constantes (20-22°C e humidade relativa 40-60%) e de acordo com metodologia e recomendações previamente publicadas [9].

A função “envelope” da pele foi avaliada através dos sistemas Cutometer® MPA580, Reviscometer® RV600 e Cutiscan® CS 100, da CK Electronics (Colónia, Alemanha), utilizados por permitirem abordagens não-invasivas, consistentes e diversificadas da avaliação da biomecânica da pele e as variáveis obtidas serem representativas [4,9,10].

Com os aparelhos Cutometer® e CutiScan® utilizamos o modo de medição time/strain, ajustado para um ciclo de sucção com uma pressão constante de 400 mbar, mantida durante cerca de 3s, e seguida por um período de relaxamento de cerca de 3s [4,10].

Para o Cutometer® os descritores escolhidos foram - U_f (distensão máxima da pele) e U_a (recuperação máxima da deformação após o fim do período de deformação), expressas em mm e U_r/U_e (função elástica) e U_v/U_e (índice de viscoelasticidade), expressas em %. Para o sistema Reviscometer®, selecionamos o RRT (Resonance Running Time), medido nos ângulos 0°, 45°, 90° e 135° (expressa em UA - unidades arbitrárias). Para o Cutiscan® escolhemos a variável V3, o rácio entre V2 e V1 em % (fórmula: $V2 \times 100 / V1$), ou seja, a relação entre a taxa de retorno durante o tempo de relaxamento (V2) e o deslocamento máximo durante o tempo de sucção (V1), medida nos ângulos 0°, 45°, 90° e 135°, e relacionada com a viscoelasticidade e anisotropia da pele [6,7].

As medições foram efetuadas uma vez em cada voluntário em três regiões anatómicas: a zona média da fronte; a face antero lateral interna da perna; e a face anterior do antebraço, regiões com características intrínsecas e fatores de alteração diferentes.

Foi definida uma posição específica do voluntário e das sondas dos aparelhos, que foram marcadas, de forma a garantir a uniformidade das medições.

A análise estatística (descritiva e comparativa) foi realizada através do programa SPSS (v 21.0, IBM, Nova Iorque, EUA). Foi feita uma análise não-paramétrica aplicando o teste Mann Whitney U, para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as regiões anatómicas, com

der to check for statistically significant differences between the anatomical areas, with each device. A significance level of 95 % was adopted.

Results and Discussion

This study analysed the intra-individual differences in biomechanical variables, obtained with each device used.

Regarding the results obtained with the Cutometer® (Table 1 and Figure 1), the most significant results were observed for total extensibility (U_f) - lower in the leg and higher in the forearm. Deformation recovery (U_a) varied consistently with the overall extensibility of the skin (U_f), which would be expected. In regard to the elastic function (U_r/U_e), the leg was the region of highest value, with a statistically significant difference from the forehead, which has the lowest value. These differences were expected and are mainly due to changes in the elastic fiber complex [12]. They may be related to the fact that the front is the area most exposed to external aggressive issues. Regarding U_v/U_e , it was found that the skin has poorest viscoelastic characteristics in the front [13].

os diversos aparelhos. Foi adotado um intervalo de confiança de 95 %.

Resultados e Discussão

Neste estudo foram analisadas as diferenças intraindividuais das variáveis biomecânicas, obtidas com os três equipamentos utilizados.

Relativamente aos resultados obtidos com o Cutometer® (Tabela 1 e Figura 1), destacam-se como mais significativos os resultados da extensibilidade total (U_f) - mais reduzida na perna e mais elevada no antebraço. A recuperação da deformação (U_a) variou consistentemente com a extensibilidade total da pele (U_f), o que seria de esperar. Quanto à função elástica (U_r/U_e), a perna foi a região que apresentou um valor mais elevado, com uma diferença estatisticamente significativa em relação à fronte, que tem o menor valor. Estas diferenças eram de esperar e devem-se principalmente a alterações na rede de fibra elástica [12]. Podem estar relacionadas com o facto de a fronte ser a região mais exposta a fatores agressores externos. Em relação a U_v/U_e , verificou-se que a pele tem piores características viscoelásticas nesta região [13].

Table 1/ Tabela 1 - Biomechanical data (mean±s.d.) obtained by the Cutometer® system for the indicated descriptors, showing the intra-individual differences in different anatomical areas of the studied population (U_f and U_a in mm; U_r/U_e and U_v/U_e in %).

Dados biomecânicos (média±d.p.) obtidos através do sistema Cutometer® para os descritores indicados, evidenciando as diferenças intraindividuais, em diferentes regiões anatómicas, da população estudada (U_f e U_a em mm e U_r/U_e e U_v/U_e em %).

	Uf		Ur/Ue		Uv/Ue		Ua	
	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.
Forehead / Fronte	2.358	0.270	0.080	0.034	0.090	0.025	0.392	0.205
Leg / Perna	2.028	0.223	0.099	0.037	0.093	0.028	0.350	0.227
Forearm / Antebraço	2.705	0.123	0.089	0.033	0.030	0.015	0.612	0.235

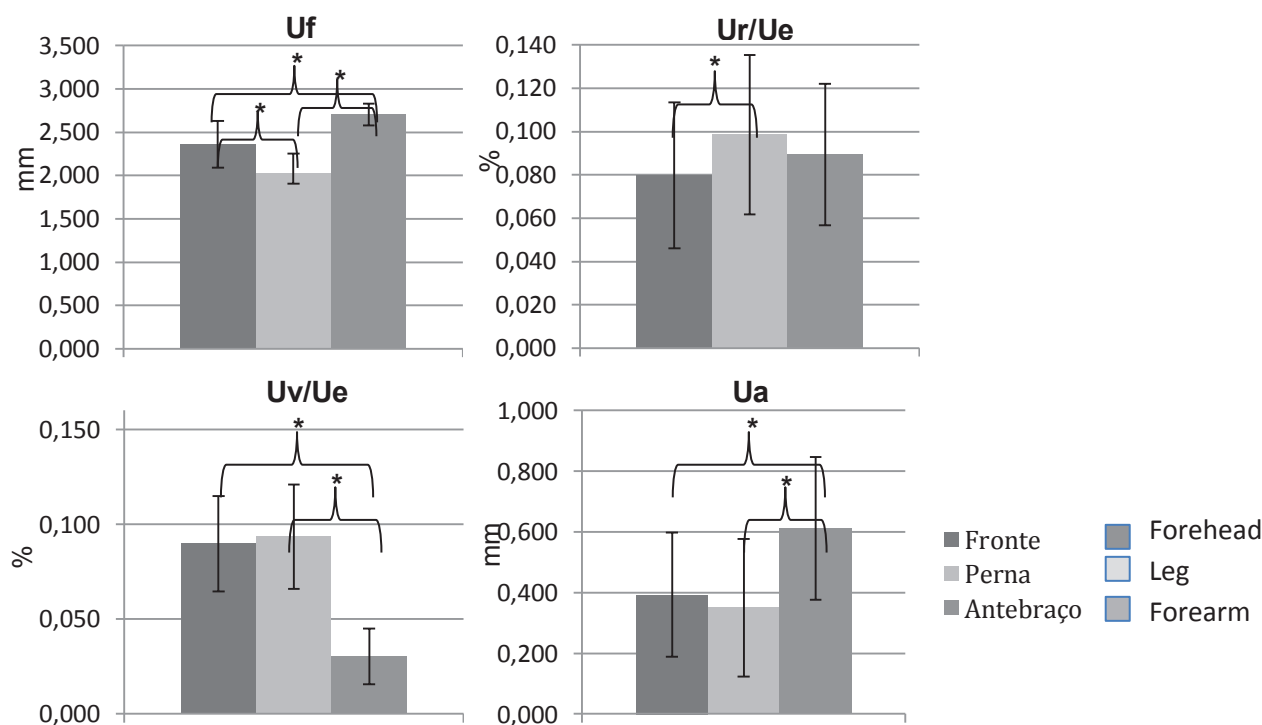


Figure 1/ Figura 1 - Biomechanical data (mean±s.d.) obtained by the Cutometer® system for the indicated descriptors, showing the intra-individual differences in different anatomical areas of the studied population. The statistical comparison refers to data obtained using the *Mann-Whitney U* test (* p<0.05).

Dados biomecânicos (média±d.p.) obtidos através do sistema Cutometer® para os descritores indicados, evidenciando as diferenças intraindividuais, em diferentes regiões anatômicas, da população estudada. A comparação estatística refere-se aos dados obtidos com o teste de *Mann Whitney U* (* p<0,05).

The results obtained with the Reviscometer® (Table 2 and Figure 2) showed statistically significant differences between the several anatomical areas. The differences in the *RRT* values show that the forehead and forearm have more similar elasticity, as the elasticity of the leg differs from both. The forearm is the region with the highest *RRT* measurement, resulting lowest elasticity, while the skin of the leg is more elastic. Low *RRT* should also correspond to a more parallel alignment of the fibers and so to a reduced anisotropy [14], as is found in the leg. These results support an intrinsic difference in this regions. Previous studies have shown that the *RRT* values are dependent on the body region, being influenced by some characteristics such as the stress, the gravitational force, the stiffness and skin hydration which differ according to the body site. In addition, other *RRT* determinant factors such as collagen content and elasticity, will also differ according to the body site [15,16]. These differences may also be due to the skin of

Os resultados obtidos com o Reviscometer® (Tabela 2 e Figura 2) mostraram diferenças estatisticamente significativas entre as várias regiões anatômicas. As diferenças nos valores de *RRT* mostram que a fronte e o antebraço têm elasticidades mais semelhantes, enquanto a elasticidade da perna difere de ambas. O antebraço é a região com o valor de *RRT* mais elevado, tendo por isso a menor elasticidade, enquanto a pele da perna é a mais elástica. Um valor reduzido *RRT* deve ainda corresponder a um alinhamento mais paralelo das fibras e por isso a uma menor anisotropia [14], o que se verificou na perna. Estes resultados podem ser explicados por se tratar de uma diferença inata, já que estudos anteriores têm mostrado que os valores de *RRT* são dependentes da localização corporal, sendo influenciado por características tais como a tensão, a força gravitacional, a rigidez e a hidratação da pele, que variam de acordo com o local do corpo. Além disso, outros fatores determinantes do *RRT*, tais como o conteúdo em colagénio e a elasticidade, também variam de acordo com a região corporal [15,16]. Essas diferenças podem ainda dever-se ao facto de

the forearm and the forehead are more exposed to external factors, in comparison to the skin of the leg.

a pele do antebraço e da fronte estarem mais expostas a fatores externos que a pele da perna.

Table 2/ Tabela 2 - Biomechanical data (mean $\pm$ s.d.) obtained by the Reviscometer[®] system for the descriptor RRT, showing the intra-individual differences in different anatomical areas of the studied population (RRT in AU).

Dados biomecânicos (média $\pm$ d.p.) obtidos através do sistema Reviscometer[®] para o descritor RRT, evidenciando as diferenças intraindividuais, em diferentes regiões anatômicas, da população estudada (RRT em UA).

	RRT (0°)		RRT (45°)		RRT (90°)		RRT (135°)	
	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.
Forehead / Fronte	117.7	46.4	117.7	36.1	117.1	48.1	99.5	28.9
Leg / Perna	73.2	21.9	73.2	15.8	64.3	10.9	70.8	20.6
Forearm / Antebraço	136.6	31.8	136.6	52.9	128.9	37.7	123.8	39.6

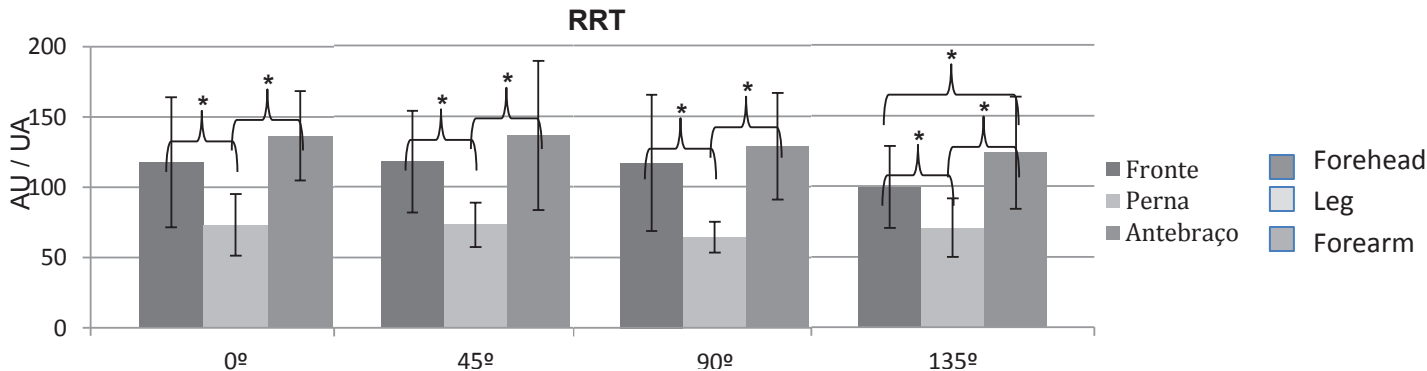


Figure 2/ Figura 2 - Biomechanical data (mean $\pm$ s.d.) obtained by the Reviscometer[®] system for the descriptor RRT, showing the intra-individual differences in different anatomical areas of the studied population. The statistical comparison refers to data obtained using the *Mann-Whitney U* test (* $p < 0.05$)

Dados biomecânicos (média $\pm$ d.p.) obtidos através do sistema Reviscometer[®] para o descritor RRT, evidenciando as diferenças intraindividuais, em diferentes regiões anatômicas, da população estudada. A comparação estatística refere-se aos dados obtidos com o teste de *Mann Whitney U* (* $p < 0,05$)

The results obtained with the Cutiscan® (Table 3 and Figure 3) also showed significant differences between most of the anatomical sites. Between the forehead and the leg were statistically significant differences at all angles, which can be attributed to the front area is the most exposed to external factors, while the leg is the least exposed. The differences between the forearm and the leg were insignificant. It was also found that in all grades, the measurement of the forehead was the highest and the measurement of the leg was the lowest. In the forehead, V3 was close to 100 % in most of the angles. Taking into account the significance of V3, the return of the skin to the initial position was very similar to the maximum displacement.

In accordance with the analysis of the results obtained with the three devices, we found that the most anatomical sites and evaluated descriptors had statistically significant differences, although we have not identified a common general trend, only results matching with some descriptors.

Os resultados obtidos com o aparelho Cutiscan® (Tabela 3 e Figura 3) mostraram também a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a maioria das regiões anatômicas. Entre a frente e a perna existiram diferenças estatisticamente significativas em todos os ângulos, o que pode ser atribuído ao facto de a frente ser a região mais exposta a fatores externos, enquanto a perna é a região menos exposta. As diferenças entre o antebraço e a perna foram pouco significativas. Verificou-se ainda que, em todos os graus, o valor medido na frente foi o mais elevado e o valor obtido para a perna foi o menor. Tendo em conta o significado da variável V3, na frente este valor foi, na maioria dos ângulos, próximo de 100 %, tendo sido por isso o retorno da pele à posição inicial muito semelhante ao deslocamento máximo.

Da análise dos resultados obtidos com os três aparelhos verificou-se que na maioria das regiões anatômicas e variáveis avaliadas existiram diferenças estatisticamente significativas embora não tenhamos identificado uma tendência geral comum mas uma correspondência de resultados de algumas variáveis.

Table 3/ Tabela 3 - Biomechanical data (mean±s.d.) obtained by the Cutiscan® system for the descriptor V3, showing the intra-individual differences in different anatomical areas of the studied population (V3 in %).

Dados biomecânicos (média±d.p.) obtidos através do sistema Cutiscan® para o descritor V3, evidenciando as diferenças intraindividuais, em diferentes regiões anatômicas, da população estudada (V3 em %).

	V3 (0°)		V3 (45°)		V3 (90°)		V3 (135°)	
	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.	Mean / Média	s.d. / d. p.
Forehead / Fronte	68.62	57.71	105.92	87.87	105.82	81.86	107.28	81.16
Leg / Perna	30.15	12.33	48.74	17.56	51.55	19.15	53.93	20.18
Forearm / Antebraço	54.39	22.10	54.76	22.25	57.43	22.26	58.18	23.01

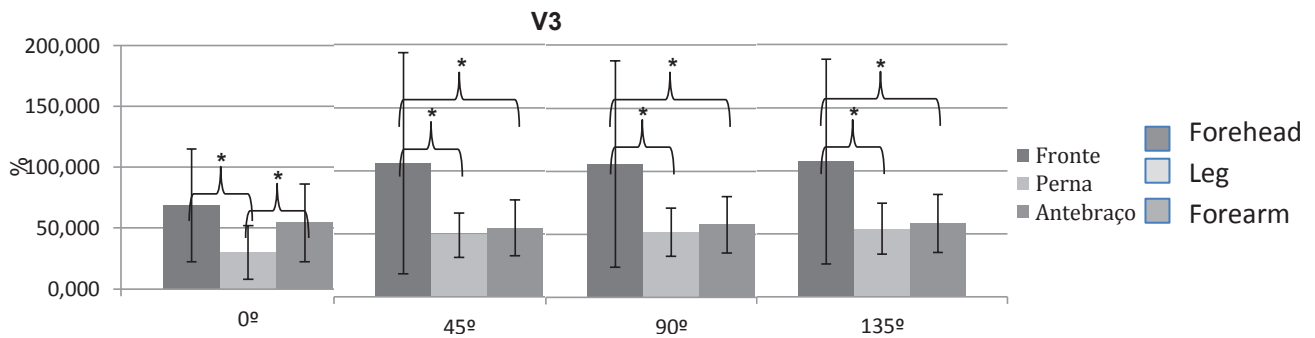


Figure 3/ Figura 3 - Biomechanical data (mean±s.d.) obtained by the Cutiscan[®] system for the descriptor V3, showing the intra-individual differences in different anatomical areas of the studied population. The statistical comparison refers to data obtained using the *Mann-Whitney U* test (* $p < 0.05$).

Dados biomecânicos (média±d.p.) obtidos através do sistema Cutiscan[®] para o descritor V3, evidenciando as diferenças intraindividuais, em diferentes regiões anatómicas, da população estudada. A comparação estatística refere-se aos dados obtidos com o teste de *Mann-Whitney U* (* $p < 0,05$).

Conclusion

Concluding with the above, and with the results of this study compared with previous studies, significant correlations between the measurements obtained with different devices, as well as with the anatomical area, were detected. There are differences in measured biomechanical properties among different areas.

The Cutometer[®], the Reviscometer[®] and the Cutiscan[®] devices are all non-invasive approaches to study the skin's biomechanical behaviour, and as such, improve upon the assessment of skin function and topical therapeutic efficacy. The Cutiscan[®] CS 100 is a device with a more complex approach to the evaluation of the skin, and combining the evaluation of viscoelasticity and anisotropy may have influenced the results obtained. However, it offers an unusually complete biomechanical study of *in vivo* skin, which deserves to be more consistently explored.

Conflict of Interests

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

Conclusão

Face ao exposto, aos resultados deste estudo e comparação com estudos anteriores, verifica-se existirem correlações significativas entre as medições obtidas com os diferentes aparelhos, tal como com a região anatómica avaliada. Verifica-se assim existirem diferenças nas propriedades biomecânicas avaliadas, entre as diferentes regiões.

Os aparelhos Cutometer[®], Reviscometer[®] e Cutiscan[®] constituem todas abordagens não invasivas do comportamento biomecânico da pele, sendo, também por este motivo, mais-valias na avaliação da função cutânea e da eficácia terapêutica tópica. O facto de se tratar de um equipamento com uma abordagem mais complexa da avaliação da pele, combinando avaliação da anisotropia e da viscoelasticidade, podem ter condicionado os resultados obtidos com o Cutiscan[®] CS 100. Contudo, este oferece uma tão completa quanto invulgar possibilidade de análise biomecânica da pele *in vivo* que merece ser mais consistentemente explorada.

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] Nishimori Y, Edwards C, Pearse A, Matsumoto K, Kawai M, Marks R. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2001;11(6):1458-1463.
- [2] Sponchiado G, Mello-Sampayo C, Pereira MM, Silva H, Otuki MF, Silva-Lima B, Rodrigues LM. Rat skin physiology is modified by age. *Biomed Biopharm Res*. 2012;2(9):199-206.
- [3] Gahagnon S, Mofid Y, Josse G, Ossant F. Skin anisotropy in vivo and initial natural stress effect: A quantitative study using high-frequency static elastography. *Journal of Biomechanics*. 2012;45(16):2860-2865.
- [4] Rodrigues L. EEMCO Guidance to the in vivo Assessment of tensile functional properties of the skin. Part 2: instrumentation and test modes. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. 2001;14:52-67.
- [5] Archer CB. Functions of the skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. Oxford: Blackwell; 2004. p. 129-140.
- [6] Courage+Khazaka. Cutiscan® CS 100. [Web page] Köln, Germany: Courage+Khazaka electronic GmbH [updated 2014 May; cited 2014 Aug]; Available from: <http://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/273-cutiscan-e>
- [7] Courage+Khazaka. Information and Operating Instruction for the CutiScan® CS 100. Köln, Germany. 2014 Oct.
- [8] World Medical Association declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human subjects [Internet]. 1964 Jun [updated 2013 Oct; cited 2014 Jun]; Available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
- [9] Pierard 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 Pharmacology and Applied Skin Physiology*. 1999;12(6):352-362.
- [10] Seidenari S, Giusti F, Pellacani G. Non-Invasive Methods and Assessment of skin diseases. In: Serup J, Jemec G, Grove G, editors. *Handbook Non-Invasive Methods and the skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006:37-46.
- [11] Darlenski R, Sassning S, Tsankov N, Fluhr JW. Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties. *Eur J Pharm and Biopharm*. 2009; 72:295-303.
- [12] Firooz A, Sadr B, Babakoohi S, Sarraf-Yazdy M, Fanian F, Kazerouni-Timsar A, Nassiri-Kashani M, Naghizadeh MM, Dowlati Y. Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender, and Body Region. *The Scientific World Journal*. 2012;2012(1100).
- [13] Tavares L, Palma L, Santos O, Almeida MA, Bujan MJ, Rodrigues LM. Impact of overweight on the normal physiology of human in vivo skin. *Biomed Biopharm Res*. 2013;1(10):55-63.
- [14] Verhaegen P, Res EM, Engelen A, Middelkoop E, Zuijlen P. A reliable, non-invasive measurement tool for anisotropy in normal skin and scar tissue. *Skin Research and Technology*. 2010;16:325-331.
- [15] Verhaegen P, Zuijlen P, Pennings NM, Marle J, Niessen FB, Horst C. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17:649-656.
- [16] Xin S, Man W, Fluhr J, Song S, Elias PM, Man M. Cutaneous Resonance Running Time Varies with Age, Body Site and Gender in a Normal Chinese Population. *Skin Research and Technology*. 2010;16(4):413-421.