

A Utilização da Biopsia Superficial Cutânea como Modelo de Estudo *In Vivo* da Lesão Cutânea

Using Skin Surface Biopsy as an In Vivo Model to Study Skin Lesion

Maria Madalena Pereira , Joana Saraiva, Luís Monteiro Rodrigues

UDE - Unidade de Dermatologia Experimental, Universidade Lusófona (Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde), Campo Grande 376 1749 024 Lisboa, Portugal

E-mail: madalena.pereira@gmail.com

Resumo

A Biopsia Superficial Cutânea (BSC) é uma técnica de fácil aplicação com potencial interesse como micromodelo de estudo da lesão e reparação cutânea *in vivo*. De facto a BSC ao alterar a integridade da pele compromete a sua função de “barreira” permitindo a monitorização quantitativa dos processos fisiopatológicos envolvidos. Neste contexto este trabalho tem como objectivo a avaliação do impacto da BSC sobre as propriedades funcionais da pele, bem como da sua utilização como modelo de estudo da lesão cutânea.

As variáveis consideradas relevantes para o presente trabalho, obtidas por meios não invasivos, foram a perda transepidermica de água (PTEA), a coloração, a microcirculação local e a ecoestrutura da pele.

Os resultados mostram que a BSC alterou significativamente as propriedades funcionais da pele, sugerindo tratar-se de um modelo com interesse para a avaliação e monitorização, *in vivo*, dos mecanismos envolvidos quer na lesão cutânea quer na sua recuperação após lesão.

Palavras chave: Biopsia Superficial Cutânea; lesão cutânea; micromodelo; acesso não-invasivo

Abstract

The Skin Surface Biopsy (SSB) is an easy application technique with an interesting potential to be used as a micromodel to study *in vivo* human skin lesion and recovery mechanisms. It is known that the SSB application modifies skin's integrity and compromises its barrier function. As a consequence, it allows the quantitative monitoring of the implied pathophysiological mechanisms. The main objective of this study is to evaluate the SSB impact in the functional properties of the skin and the application of this strategy to study the cutaneous wound.

The considered relevant variables were obtained through non invasive techniques, being Transepidermal Water Loss (TEWL), Colorimetry, Local microcirculation and ecogenecity of the skin.

Results suggest that SSB significantly changed the functional properties of the skin, suggesting that this model may be interesting to monitor *in vivo* the evaluation of the mechanisms involved in cutaneous lesion and healing.

Keywords: Skin Surface Biopsy, Cutaneous lesion, Micromodel, Non-invasive access

Introdução

A alteração da integridade cutânea, seja qual for a sua causa, altera a funcionalidade da pele designadamente no que respeita à sua função “barreira”^[1]. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos são muito complexos e têm motivado múltiplas abordagens na tentativa de melhor os conhecer^[2-4]. O desenvolvimento de modelos experimentais de estudo in vivo assume desta forma um papel relevante, tendo sido propostos diversos micromodelos experimentais para o estudo da lesão cutânea in vivo. É o caso

- dos modelos de lesão induzida através de “provocadores” químicos com substâncias orgânicas como a Acetona, o Tolueno, o Hidróxido de sódio, o Ácido Láctico ou o Lauril Sulfato de Sódio (LSS)
- dos modelos de lesão mecânica produzida através de tape stripping^[5-7].

Em qualquer caso, estes modelos permitem alterar a integridade cutânea e a função de “barreira” epidérmica, de forma controlada, permitindo a quantificação in vivo de vários indicadores funcionais da pele^[6-9].

A Biopsia Superficial Cutânea (BSC) ao remover camadas sucessivas de células do estrato córneo altera as propriedades funcionais da pele, as quais podem ser avaliadas através de diversas técnicas biométricas não invasivas^[8].

O presente estudo procurou avaliar o impacto da Biopsia Superficial Cutânea (BSC) sobre as propriedades de “barreira” da pele e a sua possível contribuição como modelo de estudo da lesão e da reparação cutâneas.

Material e Métodos

Foi utilizada uma amostra de conveniência constituída por 8 indivíduos saudáveis, do sexo feminino, com idades compreendidas entre 20 e os 25 anos ($\bar{x} = 22,6 \pm 1,1$). Os voluntários foram seleccionados após consentimento informado, de acordo com critérios de inclusão previamente estabelecidos e no pleno respeito de todas as normas éticas previstas pela Declaração de Helsínquia e respectivas emendas^[11-14].

A biopsia superficial cutânea foi executada com cianoacrilato (Super Glue, China). De acordo com os preceitos técnicos antes publicados^[10, 15, 16] uma gota de cianoacrilato foi colocada sobre uma lâmina de vidro e esta colocada sobre a zona de pele em estudo, e sujeita a uma pressão de 200g (através de um cilindro para garantir uma pressão constante) durante 5 minutos. A lâmina foi posteriormente retirada de forma rápida. O procedimento foi repetido 6 vezes consecutivas.

A área anatómica escolhida foi a região central da face anterior do antebraço por ser um local quase desprovido de pilosidade e ser de fácil acesso. Em cada voluntário

Introduction

Cutaneous integrity changes, no matter its origin, modify the skin functionality, namely, its barrier function^[1]. The pathophysiological mechanisms involved are so complex that inspired multiple approaches to look further into these domains^[2-4]. The development of experimental models to study in vivo these processes is most relevant. So, several experimental micromodels were proposed to study cutaneous lesions in vivo. It is the case of the induced models of lesion with a chemical “provocative agent” using organic components such as acetone, toluene, sodium hydroxide, lactic acid or lauryl sodium sulphate (LSS), and the mechanical lesion produced by the tape stripping.^[5-7]

In any case, these models allows a controlled impairment of the cutaneous integrity and “barrier” function as well, making possible the in vivo quantitative measurement of several indicators of skin functionality.^[6-9]

The SSB, by removing successive layers of stratum corneum cells, modify the skin functional properties, that may be evaluated by multiple biometric non-invasive techniques.^[8]

The present work aims to evaluate the impact of the SSB over the skin barrier properties and, to establish its eventual contribution as a lesion – healing study model.

Material and Methods

A convenience sample including eight healthy female, aged 20 to 25 years ($\bar{x} = 22.6 \pm 1$) was used. Volunteers were selected after informed consent, according to previously established inclusion criteria, in full compliance with all ethical principles stated in the declaration of Helsinki and respective amendments.^[11-14]

The SSB was carried out with Cyanoacrylate (Super Glue, China). Accordingly with the previously published technical procedures^[10, 15, 16], a Cyanoacrylate drop was placed in a glass slide in contact with the skin. A 200g pressure was exerted with a weight cylinder in order to ensure a constant pressure for 5 minutes. The slide was quickly removed. This procedure was repeated for 6 consecutive times.

The ventral aspect of both forearms was selected since it is an easy access, no hair area. Two experimental symmetrical sites were marked in both forearm. Following randomization, site A was submitted to SSB procedure while the local collateral site D, was kept intact and used as a negative control.

foram seleccionados 2 sítios experimentais, um em cada antebraço de forma simétrica. Após aleatorização (quadrado latino) o local A foi sujeito a BSC enquanto que o local B contralateral, permaneceu intacto, sendo utilizado como controlo negativo.

As variáveis escolhidas foram:

- a perda trans-epidérmica de água, obtida por evaporimetria, expressa em g/h.m² (Tewameter TM300 CK electronics, Germany). A PTEA é considerada como o melhor indicador quantitativo na avaliação das propriedades de barreira cutânea^[17]

- o parâmetro a* detectado por colorimetria, expresso em unidades arbitrárias (U.A.) (Chromameter® CR 300, Minolta, Japan). Vários estudos demonstram a relação desta variável com o eritema cutâneo relacionando-o com a resposta inflamatória da pele a estímulos diversos^[18-21].

- a microcirculação local medida por fluxometria de laser-doppler, expressa em unidades arbitrárias de perfusão (BPU's) (Periflux® PF5010, Perimed, Suécia). A alteração da integridade cutânea pode provocar alterações na microcirculação sanguínea local^[22-26].

- a ecoestrutura da pele nomeadamente a espessura total, expressa em mm, e a análise de segmentação ecogénica (0-30) expressa em % (Dermascan C® CórteX Technology Hadsund, Dinamarca). A ultrasonografia de alta definição (17 MHz) é uma técnica não invasiva muito útil na avaliação e na monitorização da estrutura cutânea, bem como na quantificação do edema por vezes associado à lesão^[27].

Todas as variáveis foram determinadas em condições basais e após BSC. As avaliações foram efectuadas em ambiente laboratorial, em condições de temperatura e humidade controladas (21 ± 1°C; 45 ± 5%), na ausência de fontes de calor e de convecção forçada, de acordo com metodologia e recomendações previamente publicadas^[17, 20, 22, 28-33].

O tratamento dos dados incluiu estatística descritiva e estatística comparativa recorrendo aos programas SPSS (versão 14.0 para Windows) e Microsoft Excel® 2003. A análise comparativa foi realizada através dos testes não paramétricos de Friedman e de Wilcoxon para dados emparelhados, adoptando-se um nível de significância de 95%.

Resultados e Discussão

Os resultados relativos à caracterização biométrica dos indivíduos estudados estão sistematizados na tabela 1. Relativamente à média dos valores analisados podemos observar que a BSC provocou um aumento dos valores para todas as variáveis em estudo.

A PTEA é uma das variáveis mais relevantes na avaliação da função de “barreira” cutânea^[13] razão pela qual a sua variação foi assumida como “end point”

Selected variables were:

- The Transepidermal Water Loss, obtained by evaporimetry, expressed in g/h.m² (Tewameter TM300 CK electronics, Germany). The TEWL is regarded as the best indicator to quantitatively describe skin barrier properties.^[17]

- The parameter a* evaluated by Colorimetry, expressed in arbitrary units (Chromameter® CR 300, Minolta, Japan). Several studies demonstrated the relationship of this variable with the cutaneous erythema and the skin's inflammatory response various stimulus.^[18-21]

- The local microcirculation measured through Laser Doppler Flowmetry (LDF), expressed in arbitrary perfusion units (BPU's) (Periflux® PF5010, Perimed, Suécia). The modification of cutaneous integrity can evoke local microcirculation changes^[22-26]

- The echostructure of the skin, namely the total thickness, expressed in mm, and the segmentation analysis (ecogenecity 0-30), expressed in percentage (Dermascan C® CórteX Technology Hadsund, Dinamarca). The high resolution sonography (17MHz) is a very useful non invasive technique for the evaluation and monitoring of the cutaneous structure, also useful to quantify the oedema which is often associated to the lesion^[27]

All variables were assessed in basal conditions and after SSB. Evaluations, were carried out in laboratory environment accordingly with the methodologies and recommendations previously published (controlled room humidity 45 ± 5%, and temperature 21 ± 1°C; no heat or convection sources)^[17, 20, 22, 28-33]

For data analysis, SPSS (v.14.0 for Windows) and MS Excel® 2003 software were used. The Friedman and Wilcoxon non parametric tests for paired data were chosen for comparative statistical evaluation, and a 95% significance level adopted.

Results and Discussion

Results regarding the biometric characterization of the sample are presented in Table 1.

Considering the obtained mean values, it is clear that SSB does increase all the studied variables.

The TEWL is one of the most relevant variables to the evaluation of the cutaneous barrier function^[13], so we assumed its variation as the study's statistical end point. An altered barrier will allow higher permeation of the

estatístico do estudo. Uma barreira alterada irá permitir um aumento da permeação de vapor de água. A alteração dos valores de microcirculação local e da cromaticidade vermelha (a^*) são indicativos de resposta inflamatória com existência de eritema, e a pequena alteração dos valores de espessura total e da segmentação 0-30 poderão indiciar a presença de edema.

O aumento destas variáveis revela um compromisso da função de barreira cutânea.

water vapour. Regarding local microcirculation and red chromaticity (a^*) these are indicators of the inflammatory response together with erythema. Changes in the total skin thickness and increasing the echogenic 0-30 band normally reveals the presence of oedema.

These values evolution indicates a barrier impairment.

Variável <i>Variables</i>	Local <i>Site</i>	Valores (média ± desvio padrão) Values (mean standard ± deviation)	
		Basal	Após BSC <i>After SSB</i>
PTEA / TEWL (g/h.m ²)	A	9,0±3,4	44,6±21,5
	B	8,0±3,3	-
Fluoxometria de Laser Doppler/ <i>Laser Doppler Flowmetry (BPU)</i>	A	6,7±2,3	50,8±41,6
	B	8,1±2,4	-
Colorimetria (a^*) / <i>Colorimetry (UA)</i>	A	7,0±1,3	11,8±4,4
	B	7,1±1,7	-
Segmentação 0-30/ <i>Segmentation (%)</i>	A	0,15±0,02	0,16±0,04
	B	0,15±0,03	-
Espessura Total <i>Full Thickness (mm)</i>	A	27,74±3,08	29,73±3,56
	B	26,64±2,37	-

Tabela 1 – Média e desvio padrão em condições basais e 5 minutos após a BSC (D0) para as variáveis de PTEA (g.h/m²), Microcirculação cutânea (BPU), Colorimetria cutânea (UA), espessura total (mm) e Segmentação 0-30 (%) da pele (Local A – Local experimental sujeito a BSC e Local B – Local não sujeito a BSC utilizado como controlo negativo)

Table 1 - Mean and standart deviation of TEWL (g.h/m²), local flow (BPU), erythema (UA) full thickness (mm) and segmentation 0-30 (%) obtained in basal conditions and 5 minutes after SSB (Local A – subjected to experimental SSB and Local B – experimental area not submitted to BSC and used as negative control).

A determinação das diferentes variáveis utilizadas na caracterização funcional da pele (PTEA, microcirculação local, eritema e o edema) pode ser afectada por diversos factores intrínsecos ou extrínsecos (relacionados com as condições ambientais e com o equipamento utilizado)^[15, 18, 20, 26-31]. As condições de trabalho laboratoriais permitem reduzir, para valores negligenciáveis a possível influencia dos factores ambientais daqueles relacionados com o equipamento. No que respeita à variabilidade intra e inter-individual a definição rigorosa dos critérios de inclusão e de não inclusão é crucial. A potencial influência destes factores foi testada comparando os valores basais de todos os indivíduos (Tabela 2).

Variables used to characterize skin functions (TEWL, local microcirculation, erythema and edema) may be influenced by several intrinsic or extrinsic factors (related to the environmental conditions and the equipment)^[15, 18, 20, 26-31]. The laboratory work conditions, allows to minimize the potential variation of the environmental condition and the device related factors. Concerning the potential influence of the intra and inter-individual variability, a rigorous definition of the inclusion and non inclusion criteria is crucial.. The potential influence of these factors was tested by comparing the basal values of all volunteers (Table 2).

Avaliação Biométrica Biometric evaluation		<i>p_value</i>
PTEA/ TEWL (g/h.m ²)		0,480
Colorimetria (a*)/ Colorimetry (UA)		0,480
Fluoxometria de Laser Doppler / Laser Doppler Flowmetry (BPU)		0,157
Ecoestrutura / Echo-structure	Espessura Total Full Thickness (mm)	1,000
	Segmentação 0-30/ Segmentation (%)	0,157

Como podemos verificar os valores obtidos não revelaram a existência de diferenças significativas nos valores basais para todas as variáveis em estudo, pelo que o comportamento funcional cutâneo, é semelhante em todos os voluntários .
 A Tabela 3 evidencia o impacto da BSC sobre as propriedades funcionais em análise.

Avaliação Biométrica Biometric evaluation		<i>p_value</i>
PTEA/ TEWL (g/h.m ²)		0,005
Colorimetria (a*)/ Colorimetry (UA)		0,005
Fluoxometria de Laser Doppler / Laser Doppler Flowmetry (BPU)		0,005
Ecoestrutura / Echo-structure	Espessura Total Full Thickness (mm)	0,480
	Segmentação 0-30/ Segmentation (%)	1,000

Tabela 2 – Comparação dos valores basais obtidos nos diferentes sítios experimentais (local A e local B) para cada técnica de avaliação biométrica utilizada no estudo (p-value obtido através do teste de Friedman) (n= 8).

Table 2 - Comparison of the obtained basal results in the different experimental sites (local A and local B) for each biometric technique used (p-value obtained through Friedman test) (n= 8).

Results have shown that there are no significant differences in these values for all the variables under study meaning that the cutaneous functional behavior is similar in all individuals .

Table 3 shows the impact of the SSB on the skin.

Tabela 3 – Comparação dos valores obtidos 5' após a BSC e dos valores basais para cada técnica de avaliação biométrica utilizada no estudo (p-value obtido através do teste de Wilcoxon (n= 8).

Table 3 - Comparison of the results 5 minutes after SSB and basal values for each biometric technique used (p-value obtained through Wilcoxon test) (n= 8).

Os resultados revelaram diferenças significativas para todas as variáveis em estudo com exceção da ultrasonografia. A PTEA é especialmente sensível às condições ambientais onde é medida^[13]. Uma vez que, neste estudo as condições não dependentes do indivíduo (de temperatura, humidade, correntes de convecção...) foram controladas, o aumento significativo dos valores de PTEA só pode ser devido à alteração da integridade cutânea provocada pela BSC, o que está de acordo com estudos antes publicados^[10,34].

No que respeita à variação da microcirculação cutânea, os resultados mostram alterações significativas, embora clinicamente discretas. Tal é confirmado pela alteração do a* relacionado com o eritema, mesmo que sub-clínico. A avaliação sonográfica não evidencia alterações significativas na espessura total da pele e, a análise de segmentação 0-30, correspondendo às áreas de menor ecogenidade, correspondentes à água, não varia de modo significativo. Não se confirma assim a presença de edema e, portanto, de “inflamação” embora estes resultados sugiram que, nas presentes condições experimentais, a BSC é susceptível de provocar alguma irritação, mesmo que superficial.

Conclusões

O estudo da lesão cutânea é, pela sua prevalência e complexidade, um assunto de grande interesse investigacional. A BSC pela sua facilidade de aplicação e inocuidade constitui mais um recurso como micromodelo de estudo da lesão e da reparação da pele *in vivo*.

The results have shown significant differences for all the studied variables with exception of the ultrasonography. The TEWL is especially sensitive to the environmental conditions where measurements take place^[13]. Since in the present conditions, temperature, humidity, and other main extrinsic factors were controlled, TEWL changes can be related with the barrier impairment evoked by SSB procedure. This results agree with previously published observations^[10,34].

Regarding cutaneous microcirculation, results are clinically discrete but statistically significant. And this is confirmed by the a* modification related with erythema, even if sub-clinical. Sonography does not reveals significant changes in the total skin thickness and the segmentation analysis regarding the 0-30 band, corresponding to low ecogenity areas compatible with water, also does not change significantly. These excludes the oedema and also the inflammation. But results suggest that SSB does provoke a mild superficial irritation.

Conclusions

The study of cutaneous lesion is, for its prevalence and complexity, an highly interesting research issue. SSB its an easy practical technique, fairly innocuous, that may be used as a micromodel to study skin lesion and healing *in vivo*.

Referências / References

- [1] Treffel P, Gabard B. Stratum corneum dynamic function measurements after moisturizer or irritant application, Arch Dermatol Res. 1995; 287 (5): 474-479.
- [2] Kasting GB, Barai ND. Equilibrium water sorption in human stratum corneum. Journal of pharmaceutical sciences 2003; 92 (8): 1624-1631.
- [3] Marks R. The stratum corneum barrier: the final frontier. J Nutr. 2004; 134(8):2017-2021.
- [4] Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. American Society for Dermatologic Surgery 2005; 31: 674-686.
- [5] Rodrigues LM, Roberto MA. Characterization strategies for the functional assessment of the cutaneous lesion. Burns. 2006; 32 (7): 797-801.
- [6] Lévy JJ et al. Validation of an *in vivo* wound healing model for the quantification of pharmacological effects on epidermal regeneration. Dermatology 1995; 190: 136-141.

- [7] Pinto PC, Rodrigues LM. Desenvolvimento de um Modelo Experimental In Vivo para Avaliação da Capacidade Protectora e/ou Reparadora de Formulações Tópicas Utilizadas na Prevenção e Tratamento da Ferida Crónica. *Revista Lusófona de Ciência e Tecnologias da Saúde* 2006; 1: 53-62.
- [8] Pereira, MM. Estudo in vivo do impacto biológico de diferentes materiais de penso sobre a integridade cutânea. Diss Mest, FFUL, Lisboa 2008, 10-23.
- [9] Pereira, MM, Monteiro Rodrigues, L. Efeito da oclusão com um apósito de ácido hialurónico sobre a recuperação da barreira cutânea seguido por evaporimetria e sonografia de alta frequência. *Rev. Lusófona C&T Saúde*, 6(1), 2009, 77-85.
- [10] Rosado C, Rodrigues LM. In vivo study of the physiological impact of stratum corneum sampling methods. *Int J Cosmet Sci.* 2003; 25(1-2):37-44.
- [11] Diário da República, Lei 46/2004 de 19 de Agosto.
- [12] 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.
- [13] Note for Guidance on Good Clinical Practice, ICH E6GCP96, EMEA, 2002: 1-55.
- [14] World Medical Association declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human subjects, amended until 2004.
- [15] Bashir SJ, Chew A, Anigbogu A, Dreher F, Maibach HI, Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping, *S Res and Techn* 2001; 7:40-48.
- [16] Ohman H, Vahlquist A. In viv studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper pidermis. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 1994;4:375-379.
- [17] Tupker R.A. et al. Guidelines on Sodium Lauryl Sulphate (SLS) exposure tests, *Contact Dermatitis* 1997; 37 (2): 53-69
- [18] Westerhof W. Colorimetry. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the Skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 635-647.
- [19] Takiwaki H. Quasi-L*a*b* color measurement from digital images. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the Skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 649-651
- [20] Fullerton A et al. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. 1996; 35(1): 1-10.
- [21] Takiwaki H, Serup J. Measurement of erythema and melanin indices. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the Skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 377-383.
- [22] Berardesca E, Lévêque JL, Masson P. EEMCO Guidance for the Measurement of Skin Microcirculation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;15 (6): 442-456.
- [23] Bircher A et al. Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry. *Contact Dermatitis* 1994; 30: 65-72.
- [24] Bernardi L, Berardesca E. Measurement of Skin Blood Flow by Laser-Doppler Flowmetry. In: Berardesca E et al, eds. *Bioengineering of the skin: Methods and instrumentation*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 13-27.
- [25] Belcaro G, Nicolaides A. Laser Doppler Flowmetry: Principles of Technology and Clinical Applications. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the Skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 709-715.
- [26] Choi C, Bennett R. Laser Dopplers to Determine Cutaneous Blood Flow. *Dermatol Surg* 2003;29 (3): 272-80.
- [27] Seidenari S. Ultrasound B-Mode Imaging and In Vivo Structure Analysis. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the Skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 493-505.
- [28] Tupker RA. et al. Guidelines on sodium lauryl sulphate (SLS) exposure tests. *Contact Dermatitis* 1997; 37 (2): 53-69.
- [29] Piérard GE. EEMCO guidance for the assessment of skin colour. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 10: 1-11.
- [30] 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.
- [31] Pinnagoda J et al. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 1990; 22 (3): 164-178.
- [32] Bircher A et al. Guidelines for measurement of cutaneous blood flow by laser Doppler flowmetry. *Contact Dermatitis* 1994; 30: 65-72.
- [33] Serup J et al. High-Frequency Ultrasound Examination of Skin: Introduction and Guide. In: Serup J, Jemec G, Grove G, eds. *Handbook Non-Invasive Methods and the Skin*. 2nd ed. Texas: C.H.I.P.S.; 2006: 473-491.
- [34] Marks R, Dawber RPR. Skin surface biopsy: an improved technique for the examination of the horny layer. *Br J Derm* 1971; 84:117-123.