

Skin Barrier Function Evaluation by Bi-compartmental Analysis of TEWL Dynamical Measurements: Validation of New Analytical Conditions

*Avaliação da Função de Barreira da Pele pela Análise Bi-compartmental de Medições
Dinâmicas da PTEA: Validação de Novas Condições Analíticas*

Catarina Rosado¹, Joana Ferreira¹, Pedro Contreiras Pinto² & Luis Monteiro Rodrigues^{1,2}

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

² Dep.Pharmacol Sciences – Universidade de Lisboa (Faculty of Pharmacy)
Email: catarina.rosado@ulusofona.pt

Abstract

This paper reviews a methodology based on mathematical modelling of data of transepidermal water loss (TEWL) after conducting a plastic occlusion stress test (POST), to assess the hydric skin dynamic by kinetic parameters. Although simple to implement, this method is time-consuming, since it normally involves collecting data for at least 30 minutes. This research is aimed at optimizing the protocol by reducing the total time of the experiment by collecting more points during the initial stage. It was possible to significantly reduce analysis time, which is advantageous both for researchers and for volunteers since, on the one hand, there is a reduction in the cost of research, and on the other hand it ensures the comfort of the study participants.

Keywords: TEWL; POST; Mathematical modelling; Stratum corneum.

Resumo

Neste trabalho é revista uma metodologia baseada na modelação matemática de dados de perda transepidérmica de água (PTEA) após a realização de um plastic occlusion stress test (POST), para avaliar a dinâmica hídrica cutânea através de parâmetros cinéticos. Embora simples de executar, esta metodologia consome muito tempo, uma vez que normalmente envolve a recolha de dados durante, pelo menos, 30 minutos. Esta investigação tem como objectivo otimizar o protocolo, reduzindo o tempo total da experiência através da recolha de mais pontos na fase inicial do estudo. Foi possível reduzir significativamente o tempo de análise, o que se torna vantajoso tanto para os investigadores, como para os voluntários, uma vez que, por um lado, há redução dos custos de investigação, bem como se assegura o conforto dos participantes no estudo.

Palavras-chave: PTEA; POST; Modelação Matemática; Estrato Córneo.

Introduction

The skin is the largest organ in the human body. It performs several functions and consists of several layers. The uppermost layer, the stratum corneum (SC), is what provides, together with other characteristics, the barrier function that is so important for the human body^[1,2].

The SC contains a relatively low proportion of water compared to the water content of deeper layers of the epidermis (stratum germinativum, stratum spinosum and stratum granulosum). It consists of both proteins and lipids that act as an effective barrier against the loss of water and electrolytes, and against the entry of harmful exogenous material. However, despite the fact that it acts as a barrier and has low permeability, this layer has plenty of plasticity and elasticity to allow for movements of the skin^[1,3].

The transepidermal water loss (TEWL) is the loss of water from inside the body through the skin, in particular through the SC, as previously mentioned. The measurement of TEWL is used in several studies, which aim to evaluate the efficacy of the skin barrier^[4].

The low amount of water present in the SC allows for a flow of water, which evaporates into the environment to varying degrees, depending on climatic conditions and the integrity of the skin barrier. Some of this moisture is retained by the SC's natural moisturizing factor, whilst the invisible perspiration affects the amount of evaporated water at the skin surface. The evaporimeter is a device that allows for accurate measurement of TEWL, either in basal conditions or after application of substances which alter the efficacy of skin barrier^[5-7].

Several non-invasive methods and instruments are used for measuring the TEWL. However, the most widely used is the evaporimeter, which is based on an open gradient evaporation chamber, allowing for measurement of the gradient on the water present at the skin surface^[5].

Various methodologies have been developed to assess the efficacy of moisturizing products. The most commonly used approaches employ static methods, but they are conditioned by the fact that it is not possible to identify the source of the water detected and that it only produces instantaneous data^[7]. This paper reviews a methodology based on mathematical modelling of transepidermal water loss (TEWL) data after conducting the plastic occlusion stress test (POST), in order to assess the dynamic skin hydration by kinetic parameters^[8]. Although simple to implement, this method is time-consuming, since it normally involves collecting data for at least 30 minutes. This research is aimed at optimizing the protocol by reducing the total time of the experiment by collecting more points in the initial phase of the study.

Introdução

A pele é um órgão multifuncional no corpo humano que é constituído por vários estratos, sendo que o mais superficial, o Estrato Córneo (EC), é o que confere, juntamente com outras características, a função de barreira que é tão importante para o nosso organismo.^[1,2]

O EC contém uma proporção relativamente baixa de água, comparativamente com o conteúdo hídrico das camadas mais profundas da epiderme (Estrato Germinativo, Estrato Espinhoso e Estrato Granuloso), e, tanto as proteínas como os lípidos que o formam, actuam como uma barreira eficaz contra a perda de água e electrólitos, bem como contra o ingresso de material exógeno prejudicial. No entanto, apesar da barreira e da fraca permeabilidade, este estrato possui plasticidade e elasticidade que permite os movimentos da pele^[1,3].

A perda transepidérmica de água (PTEA) consiste na perda de água do interior do organismo pela epiderme, nomeadamente pelo EC, como já foi referido anteriormente. A medição da PTEA é usada em vários estudos que pretendem avaliar a eficácia da pele como barreira.^[4]

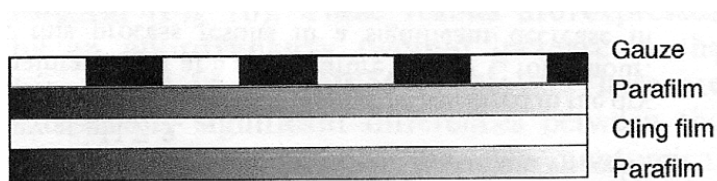
A baixa quantidade de água que se encontra no EC permite um fluxo passivo de água, a qual se evapora depois para o meio ambiente em grau variável, dependendo das condições climáticas e da integridade da barreira cutânea. Parte desta humidade é retida no EC pelo factor humectante natural enquanto que a perspiração não visível afecta, de forma variável, a quantidade de água evaporada na superfície cutânea. O evaporímetro é um aparelho de bioengenharia cutânea que permite determinar com precisão esta PTEA, quer em situações basais quer após a aplicação de substâncias que alteram a eficácia da barreira cutânea.^[5,6,7]

Existem vários métodos e instrumentos não invasivos utilizados na medição da PTEA. No entanto, o mais utilizado é o evaporímetro, método que se baseia no gradiente de evaporação de câmara aberta, permitindo a medição deste gradiente relativamente à água presente na superfície da pele^[5].

Foram desenvolvidas diversas metodologias para avaliar a eficácia de produtos hidratantes. A maioria das vezes são utilizadas abordagens que recorrem a métodos estáticos, mas estas estão condicionadas ao facto de não identificarem a origem da água detectada e apenas produzirem dados instantâneos^[7]. Neste trabalho é revista uma metodologia baseada na modelação matemática de dados de perda transepidérmica de água (PTEA) após a realização de plastic occlusion stress test (POST), para avaliar a dinâmica hídrica cutânea através de parâmetros cinéticos^[8]. Embora simples de executar, esta metodologia consome muito tempo, uma vez que normalmente envolve a recolha de dados durante, pelo menos, 30 minutos. Esta investigação tem como objectivo otimizar o protocolo, reduzindo o tempo total da experiência através da recolha de mais pontos na fase inicial do estudo.

Material and Methods

Twenty-three female volunteers participated in this study (mean age 22.3 ± 2.6 years) after informed consent. The procedure followed was in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and according to the Declaration of Helsinki. All volunteers underwent a POST, which consisted of the application of an occlusive patch in the left forearm over a period of 24 hours. The patch consisted of gauze, Parafilm™ (Neeah, Wisconsin, United States), clingfilm (Pingo Doce, Lisbon, Portugal) and Parafilm™ again, and was applied to the skin with adhesive Durapore (3M, Nadarzyn, Poland), as depicted in Figure 1.



Material e Métodos

Vinte e três voluntários do sexo feminino participaram neste estudo (idade média de $22,3 \pm 2,6$ anos), após consentimento informado. O procedimento seguido estava em conformidade com os padrões éticos do Comité responsável pela experimentação em humanos e segundo a Declaração de Helsínquia. Todas as voluntárias foram submetidas a um POST que consistiu na aplicação de um penso oclusivo, no antebraço esquerdo, durante 24h. O penso era composto por compressa, Parafilm™ (Neeah, Wisconsin, Estados Unidos da América), papel aderente (Pingo Doce, Lisboa, Portugal) e novamente Parafilm™, sendo depois aplicado na pele com adesivo Durapore (3M, Nadarzyn, Polónia), como esquematizado na Figura 1.

Figure 1 - Schematic illustration of the occlusive patch used (5)

Figura 1- Esquema ilustrado do patch oclusivo utilizado. (5)

The site chosen for the study was the middle region of the volunteers' ventral forearm, randomized to left and right arm. The site was covered by an occlusive patch for 24 hours, and TEWL was measured using a Tewameter TM300 (Courage + Khazaka electronics GmbH, Cologne, Germany) immediately after its removal. TEWL measurements were recorded every 2 seconds during the first 2 minutes, every 30 seconds for the following 5 minutes, every 60 seconds up to 20 minutes and in the last 10 minutes measurements were taken every 5 minutes. Four analysis protocols were applied and the values analyzed were at 0, 5, 10, 15 and 30 minutes. The more relevant parameter, the evaporation half-life ($t_{1/2\text{evap}}$) was compared between all protocols using software such as Excel Solver adjustment MS.

The bi-compartmental model used in this study aims to simulate the complex physiological distribution of water, where the data are analyzed as decay curves of experimental TEWL. The occlusive patch induces a prolonged skin occlusion leading to changes in the balance of water in two compartments. The model considers the barrier and inner layers of the skin as two different water compartments. The first compartment is the skin barrier with low water content, whilst the second represents the innermost layers of the skin with higher water levels. The transfer of water from these two compartments is regulated by two micro-constants ($K_{2 \rightarrow 1}$

O local escolhido para o estudo foi a região média do antebraço ventral dos voluntários, tendo sido aleatorizado o lado esquerdo e direito. O local foi coberto pelo penso oclusivo durante 24h e, imediatamente após remoção do mesmo, foi medida a PTEA, utilizando um Tewameter TM300 (Courage+Khazaka electronics GmbH, Colónia, Alemanha). Foram registados medições de PTEA a cada 2 segundos nos primeiros 2 minutos, a cada 30 segundos nos seguintes 5 minutos, a cada 60 segundos até aos 20 minutos e nos últimos 10 minutos foram feitas medições de 5 em 5 minutos. Foram aplicadas 4 análises de protocolos, sendo analisados valores de 0, 5, 10, 15 e 30 minutos. O parâmetro mais relevante, a $t_{1/2}$ de evaporação ($t_{1/2\text{evap}}$), foi comparado com todos os protocolos, utilizando como software de ajuste o MS Excel Solver.

O modelo bi-compartmental utilizado neste estudo tem como objectivo simular os mecanismos fisiológicos complexos de distribuição de água, onde se analisam os dados das curvas de decaimento experimental de PTEA. O penso oclusivo induz uma oclusão prolongada da pele levando a alterações do balanço de água nos 2 compartimentos. O modelo leva à estimulação da barreira e das camadas mais interiores da pele como dois conteúdos de água distintos. O primeiro compartimento representa a barreira da pele com baixo teor em água; enquanto que o segundo representa as

and $K_{1 \rightarrow 2}$), and the elimination of water to the exterior is adjusted by the micro-constant $K_{1 \rightarrow 0}$. The TEWL decay curves can be described by equation (1):

$$PTEA = B + I(e^{-K_{evap} \times t} - e^{-K_{hydr} \times t}) \quad (1)$$

where B represents the baseline effect; I the common multiplicative exponential; K_{evap} , the evaporation constant in assessing barrier function; and K_{hydr} , constant hydration related to the distribution of water by 2 compartments.

With the intention of simplifying interpretation of the data, K_{evap} is transformed into $t_{1/2evap}$ (half-life of evaporation) as represented in equation (2):

$$t_{1/2evap} = \frac{\ln(2)}{K_{evap}} \quad (2)$$

where $t_{1/2evap}$ is the time required by the body to reduce its water loss by half.

Another relevant parameter in data analysis, for comparison purposes, is the dynamic water mass (DWM) which represents the relevant weight of water involved in the process of desorption. This parameter is obtained by calculating the area under the curve (AUC) of t_{max} until the end of the experiment (3):

$$DWM = \int_{t_{max}}^T (B + I \times (e^{-K_{evap} \times t} - e^{-K_{hydr} \times t})) dt \quad (3)$$

After removal of the occlusive patch the mathematical model is made to fit the experimental TEWL data obtained, enabling us to obtain the parameters K_{evap} , $t_{1/2evap}$ and DWM [7,8].

Statistical Analysis

In this study, nonparametric comparisons were made (Wilcoxon sign rank test) using SPSS 17 (IBM, New York, USA), and a significance level of 0.05 was adopted.

camadas mais interiores da pele, com maiores níveis de água. A transferência de água destes 2 compartimentos é regulada por 2 microconstantes ($K_{2 \rightarrow 1}$ e $K_{1 \rightarrow 2}$); e a eliminação de água para o exterior é regulada por a microconstante $K_{1 \rightarrow 0}$. AS curvas de decaimento da PTEA podem ser descritas pela equação (1):

$$PTEA = B + I(e^{-K_{evap} \times t} - e^{-K_{hydr} \times t}) \quad (1)$$

onde B, efeito baseline; I, parâmetro multiplicativo comum às exponenciais; K_{evap} , constante de evaporação na avaliação da função barreira; K_{hydr} , constante de hidratação relacionada com a distribuição de água pelos 2 compartimentos.

Com o intuito de se simplificar a interpretação dos dados, a K_{evap} é transformada em $t_{1/2evap}$ (tempo de semi-vida de evaporação), equação (2):

$$t_{1/2evap} = \frac{\ln(2)}{K_{evap}} \quad (2)$$

Onde $t_{1/2evap}$ representa o tempo necessário para que o organismo reduza a sua perda de água para metade.

Outro parâmetro relevante na análise de dados, destinado à comparação, é a dinâmica da massa de água (DMA) a qual representa a massa de água relevante envolvida no processo de desadsorção. Este parâmetro é obtido através da área sobre a curva (AUC) do t_{max} até ao final da experiência (3):

$$DWM = \int_{t_{max}}^T (B + I \times (e^{-K_{evap} \times t} - e^{-K_{hydr} \times t})) dt \quad (3)$$

Após a remoção do penso oclusivo procedeu-se ao ajuste do modelo matemático aos dados experimentais da PTEA obtidos, permitindo obter os parâmetros K_{evap} , $t_{1/2evap}$ e DMA. [7-9]

Análise Estatística

Neste estudo, foram efectuadas comparações não paramétricas (Wilcoxon rank sign test) com o programa SPSS 17 (IBM, New York, Estados Unidos da América), tendo sido adoptado um nível de significância de 0,05.

Results

From the analysis of the results obtained it can be concluded that the bi-compartmental model described the data well and the lowest value obtained from R^2 was 0.74. The values of $t_{1/2\text{evap}}$ obtained in the 4 protocols were very similar and statistical analysis showed no major difference in the data sets collected (Fig. 2). This difference in terms of the functional barrier can be observed in each volunteer by the upper value obtained by the standard deviation. However, this value did not have any significance on the final results, since the data were analyzed in pairs.

Resultados

A partir da análise dos resultados obtidos podemos concluir que o modelo bicompartimental descreveu bem os pares de dados e o valor mais baixo de R^2 obtido foi de 0,74. Os valores de $t_{1/2\text{evap}}$ obtidos nos 4 protocolos foram muito semelhantes e a análise estatística não demonstrou grande diferença nos conjuntos de dados recolhidos (Fig. 2). Esta diferença nas condições funcionais da barreira pode ser observada em cada voluntário pelo valor superior obtido do desvio padrão. No entanto, este valor não apresentou grande relevância nos resultados finais, uma vez que os dados foram analisados em pares.

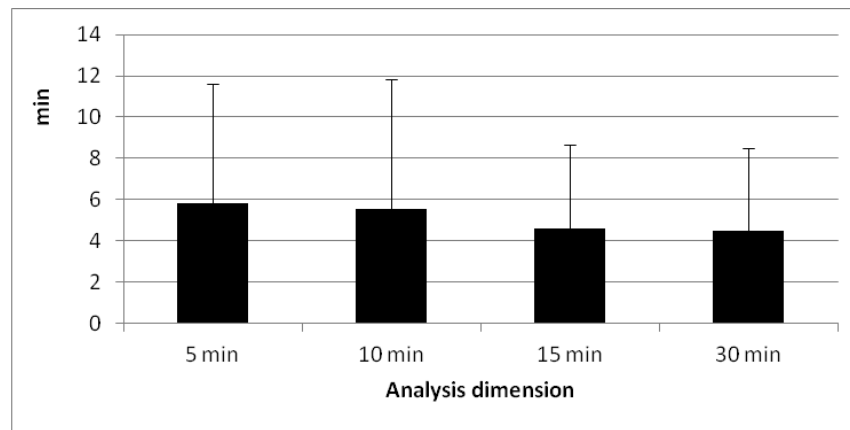


Figure 2 - $t_{1/2\text{evap}}$ obtained in the different protocols (mean SD, n=23)
Figura 2 - $t_{1/2\text{evap}}$ obtidas nos diferentes protocolos (média SD, n=23)

The majority of water loss occurred in the first minutes after removal of the occlusive patch. Thus, the typical dynamic curve is already formed after the first 5 minutes of measurements, that is, the time period covered by the first protocol. As can be seen in Table 1, there are statistically significant differences between the shorter and longer protocol (15 and 30 minutes). However, when the analysis time is extended to 10 minutes, no statistical differences were observed among the parameters obtained in the longer protocols, which leads to the conclusion that the duration of TEWL data collection can be effectively reduced from 30 minutes to only 10 minutes.

A maior parte da perda de água ocorre nos primeiros minutos após remoção do penso oclusivo. Deste modo, a forma típica da curva desta dinâmica encontra-se formada após os primeiros 5 minutos das medições, ou seja, o período de tempo abrangido pelo primeiro protocolo. Como pode ser observado na Tabela 1, há diferenças significativas entre o protocolo mais curto e os mais prolongados (15 e 30 minutos). No entanto, quando se estende o tempo de análise para os 10 minutos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os parâmetros obtidos nos protocolos mais prolongados, o que leva a concluir que a duração da recolha de dados de PTEA pode ser efectivamente diminuída de 30 minutos para apenas 10 minutos.

Table 1 - $t_{1/2}$ evap obtained in the different protocols (mean SD, n= 23)**Tabela 2** - $t_{1/2}$ evap obtidas nos diferentes protocolos (média SD, n=23)

	5 min	10 min	15 min	30 min
5 min	-	0.101	0.031	0.033
10 min	-	-	0.248	0.107
15 min	-	-	-	0.287

Discussion

Barrier function is typically assessed by instantaneous measurements of TEWL (10); however, some studies have reported a poor correlation between damage inflicted to the skin and changes in TEWL values ^[11]. Developments in the mathematical modelling of the TEWL curves that result from a plastic occlusion stress test (POST) ^[9] have contributed to a more accurate quantitative description of the cutaneous water mass balance over time. This methodology uses occlusion for 24 hours with an impermeable patch to cause water accumulation in the skin. When the patch is removed, high amounts of water evaporate from the skin surface until equilibrium is re-established. The time necessary to reach this balance is mainly dependant on the dynamic water balance established between the deep and the superficial skin structures, therefore the kinetic parameters obtained by this methodology mirror the competence of the epidermal barrier.

The dynamic methodology that relies on POST is a widely used technique in the assessment of TEWL ^[8,12]. However this has its applicability conditioned by the time-consuming data collection that is traditionally required.

After data analysis by mathematical modelling, we conclude that the higher water loss occurs in the first few seconds, and that increasing the data set collected at this stage can reduce the time for reading the data to 10 minutes, instead of the conventional 30 minutes.

The aim of this work was to optimize this methodology by assessing whether there may be a reduction in analysis time, which came to prove possible. This development is advantageous both for researchers and for volunteers, since, on the one hand, it achieves a significant reduction in the cost of research, and on the other, it provides greater comfort for study participants.

Discussão

A função de barreira é normalmente avaliada por medições instantâneas de PTEA (10), no entanto, alguns estudos têm relatado uma baixa correlação entre os danos causados à pele e alterações nos valores de PTEA ^[11]. Desenvolvimentos sobre a modelação matemática das curvas de PTEA que resultam de um POST ^[9], contribuíram para uma descrição quantitativa mais precisa do equilíbrio cutâneo da massa de água ao longo do tempo. Esta metodologia utiliza a oclusão durante 24 horas com um adesivo impermeável para causar a acumulação de água na pele. Quando ocorre a remoção do sistema, grandes quantidades de água se evaporam a partir da superfície da pele até que o equilíbrio seja restabelecido. O tempo necessário para atingir este equilíbrio é principalmente dependente do balanço de água dinâmica estabelecida entre as camadas mais profundas e as estruturas superficiais da pele e, assim sendo, os parâmetros cinéticos obtidos por esta metodologia espelham a competência da barreira epidérmica.

A metodologia dinâmica que assenta no POST é uma técnica muito utilizada na avaliação da PTEA ^[8,12]. No entanto, esta tem a sua aplicabilidade condicionada pelo longo tempo de recolha de dados que é tradicionalmente requerido.

Após a análise dos dados, por modelação matemática, podemos concluir que a maior perda de água ocorre nos primeiros segundos e que, aumentando o conjunto de dados recolhido nesta fase, pode haver redução do tempo de leitura dos dados para 10 minutos, em vez dos 30 minutos convencionais.

Com este trabalho pretendemos otimizar esta metodologia avaliando se é possível haver redução do tempo de análise, o que se veio a comprovar possível. Este desenvolvimento é vantajoso tanto para os investigadores, como para os voluntários, uma vez que, por um lado, se consegue uma redução acentuada dos custos de investigação, bem como se proporciona um maior conforto dos participantes no estudo.

Conflict of interest

The authors declare that there is no financial or personal relationship that might be perceived as posing a potential conflict of interest.

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]. Parra-Juez, J.L. et al., *Ciencia Cosmética – Bases Fisiológicas y criterios prácticos*, Madrid, Ed. Cons. Gen. Colegios Oficiales de Farmaceuticos, 1995.
- [2]. Firooz, A. et al. Variation of Biophysical Parameters of the Skin with Age, Gender and Body Region. *Scientific World Journal*. 2012: article ID-386936) 5 pages.
- [3]. Pinnagoda, J. et al. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis* 1990; 22: 164-178.
- [4]. Pinnagoda, J. et al. Measurement of the Transepidermal Water Loss, Department of Dermatology, Groningen, 1995.
- [5]. Barel, A. O., Clarys, P., Comparison of Methods of Transepidermal Water Loss, Laboratory of General and Biological Chemistry, Brussels, 1995.
- [6]. Rosado, C. et al. Modeling TEWL- desorption curves: a new practical approach for the quantitative in vivo assessment of skin barrier. *Experimental Dermatology* 2005; 14: 386-390.
- [7]. Rosado, C., Pinto, P., Rodrigues, L.M., Assessment of moisturizers and barrier function restoration using dynamic methods, *Skin Research and Technology*, 2009, 15 (1): 77-83
- [8]. Pinto P, Rosado C, Parreirão C, Rodrigues LM. Is there any barrier impairment in sensitive skin?: a quantitative analysis of sensitive skin by mathematical modeling of transepidermal water loss desorption curves. *Skin Res Technol*. 2011;17(2):181-5.
- [9]. Pinto PC, Pereira LM, Minhós R, Rodrigues LM. Testing the discriminative capacity of compartmental modelling for the analysis of the in vivo epidermal water content changes following topical application under occlusion. *IFSCC Magazine* 2002;5:1-6.
- [10]. Lotte C, Rougier A, Wilson DR, Maibach HI. In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch Dermatol Res* 1987;279:351-356.
- [11]. Chilcott RP, Dalton CH, Emmanuel AJ, Allen CE, Bradley ST. Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function in vitro. *J Invest Dermatol* 2002;118: 871-875.
- [12]. Pennick G, Harrison S, Jones D, Rawlings AV. Superior effect of isostearyl isostearate on improvement in stratum corneum water permeability barrier function as examined by the plastic occlusion stress test. *International Journal of Cosmetic Science* 2010, 32:304-312