

RELACIÓN ENTRE EL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL TIPO A (VEGF A) E IGE SÉRICA TOTAL EN PACIENTES ADULTOS CON DERMATITIS ATÓPICA

Relationship between Endothelial growth factor type A (VEGF A) and total serum IgE in adult patients with atopic dermatitis

Cecilia B Miranda¹, Juan Carlos Muiño², Cristina Acosta¹, Gloria Dozo^{1,3}

RESUMEN

Estudiamos la influencia del factor de crecimiento endotelial tipo A en pacientes con dermatitis atópica (DA), que es una enfermedad inflamatoria, crónica, recidivante de la piel, que altera la calidad de vida. Se ha visto que el VEGF A podría estar relacionado con la fisiopatología de esta enfermedad. Otro de los objetivos fue determinar el nivel plasmático de IgE en pacientes enfermos y sanos. Es un estudio clínico, observacional, transversal y analítico en el cual se determinó el valor de VEGF A en suero en 10 paciente con diagnóstico de DA y 10 paciente correspondiente al grupo control. Otras variables estudiadas fueron sexo, edad, antecedentes patológicos alérgicos, antecedentes familiares alérgicos, inicio de la enfermedad, sintomatología mucocutánea, valores de IgE sérica total por ELISA, pruebas de prick test con aeroalérgenos. Se analizó el VEGF-A sérico mediante inmunoensayo enzimático siguiendo las instrucciones del fabricante (Human VEGF-A Platinum) por ELISA. Como conclusión en este trabajo se pudo observar aumento de IgE total sérica y disminución de VEGF A sérico en pacientes con DA, probablemente porque se deposita en la capa córnea de la piel asociada a la respuesta de la lesión inflamatoria. Se requiere un mayor estudio para su análisis.

Palabras claves: dermatitis atópica, factor de crecimiento endotelial, IgE total sérica, VEGF.

ABSTRACT

We studied the influence of endothelial growth factor type A on patients with atopic dermatitis, which is an inflammatory, chronic, recurrent disease of the skin, which alters the quality of life. It has been shown that VEGF A may be related to the pathophysiology of this disease. Another objective was to determine the plasma level of IgE in sick and healthy patients. It is a clinical, observational, transversal and analytical study in which the value of VEGF A in serum was determined in 10 patients with diagnosis of AD and 10 patients corresponding to the control group. Other variables were sex, age, allergic pathological history, allergic family history, onset of disease, mucocutaneous symptomatology, total serum IgE values, Prick test, with common inhaled allergens. Serum VEGF-A was analyzed by enzyme immunoassay following the manufacturer's instructions (Human VEGF-A Platinum) ELISA. As conclusion, in this work it was observed that there was no relationship with the increase of serum VEGF A in patients with AD probably because it occurs in the local region of stratum corneum in the inflammatory lesion. Further study is required for analysis.

Keywords: atopic dermatitis, endothelial growth factor, IgE, VEGF.

ARCHIVOS DE ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2019;50(3):114-120

INTRODUCCIÓN

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad crónica e inflamatoria de la piel, con brotes y remisiones que suelen durar meses o años¹⁻⁵. Ella es de etiología desconocida, y resulta de las interacciones de varios factores genéticos, ambientales, locales, defectos en la función de la barrera cutánea y una serie de factores inmunológicos^{2,3,6}. La lesión elemental es la vesícula. Se presenta con prurito in-

tenso, xerosis y lesiones eccematosas, inicio a edad temprana, con frecuencia asociado a otras enfermedades atópicas como rinitis alérgica y asma. Las manifestaciones clínicas de la dermatitis atópica varían según la edad y otras formas atípicas de presentación; se pueden identificar 3 etapas; fase de la infancia, de la adolescencia y la edad adulta¹⁻⁵. Existe una sensibilización mediada por IgE a los alérgenos de los alimentos y del medioambiente (aeroalérgenos)^{1,2}. Una teoría fisiopatológica sostiene que el defecto primario reside en alteración inmunológica provocada por sensibilización mediada por IgE^{4,5,8}, con disfunción epitelial de la barrera considerada y, como consecuencia, inflamación local³. Otra propone que es un defecto intrínseco en las células epiteliales que conduce a disfunción de barrera donde los aspectos inmunológicos son considerados un epifenómeno³⁻⁵.

Epidemiológicamente, la prevalencia de DA en el mundo se ha duplicado o triplicado en los países industrializados durante los últimos treinta años; del 15 al 30% de los niños y del 2 al 10% en los adultos¹⁻⁵.

Se ha observado durante las etapas de exacerbación aumento de la expresión de IL-4 e IL-13 como parte de una

1. Cátedra-Servicio de Alergia e Inmunología y Laboratorio de Inmunología del Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

2. Director centro formador de Asociación Asma Alergia e Inmunología de Córdoba

3. Cátedra-Servicio de Alergia e Inmunología y Laboratorio de Inmunología del Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas. Director Académico de Carrera de Formación. Universidad Nacional de Córdoba

Correspondencia: Cecilia B Miranda. cebimiranda@hotmail.com

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Recibido: 11/2018 | Aceptado: 08/2019

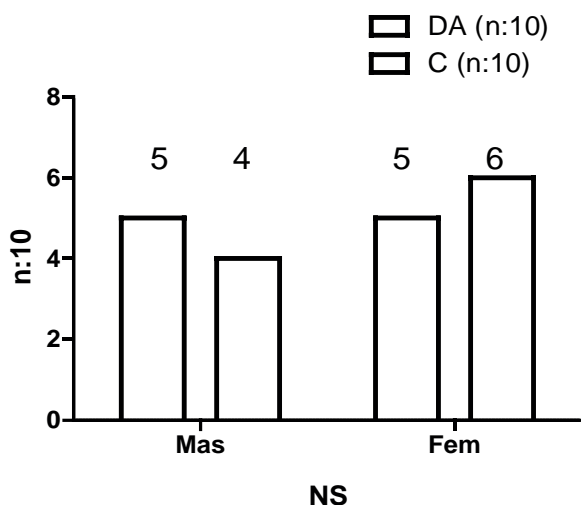


Figura 1. Sexo en dermatitis atópica (DA) y controles

respuesta exagerada TH2, las cuales se presentan de forma importante en la forma aguda y aumentan la expresión de IgE y moléculas de adhesión. La IL-5 favorece el desarrollo y la supervivencia de los eosinófilos y predomina en la forma crónica de la enfermedad^{1-5,9}.

El diagnóstico se basa en la presencia de un conjunto de síntomas y signos clínicos, junto con varias características asociadas de su historia clínica. Hanifin y Rajka establecieron en 1980 los criterios diagnósticos de DA: 4 criterios mayores y 23 menores. Se requieren 3 mayores y 3 menores para diagnosticar la patología¹⁻⁵.

La presentación clínica tiene dos formas: 1) Forma extrínseca (DAE): mediada por IgE y ocurre en el 70 al 80% de los casos. 2) Forma intrínseca: no es mediada por IgE y ocurre en el 20 al 30%. Ambas formas se asocian con eosinofilia¹⁻³. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y sus familias de receptores son reguladores de la angiogénesis tanto en la permeabilidad vascular normal como en la enfermedad^{9,10,25}; por esta razón se considera importante su estudio y análisis en esta patología. Existe un único gen para VEGF-A localizado en la región cromosómica 6p21.3. La isoforma VEGF-A desempeña un rol importante en la proliferación endotelial, la migración y la supervivencia. El VEGF-A interactúa con los receptores de VEGF-1 (Flt1) y los receptores de VEGF-2 tipo tirosina quinasa así como su correceptor neuropilina-1 (NRP-1), los cuales se expresan en células endoteliales normales⁹⁻¹¹. Tras la estimulación de VEGF-A, se activan eventos de transducción de señales, lo que produce dimerización del receptor y autofosforilación seguida por la fosforilación de la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C γ (PLC γ) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)^{9,10}. El nivel de VEGF tipo A debe estar estrechamente controlado para permitir la vasculogénesis y la angiogénesis normal⁹⁻¹¹. *En la dermatitis atópica histológicamente se caracteriza por vasos dilatados y edema perivascular que conduce a eritema y edema; se obser-*

vó que la angiogénesis es un signo anatomopatológico importante de la enfermedad^{13,15-17,19,22,25,26}.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el nivel plasmático de VEGF-A en los pacientes con dermatitis atópica y compararlo con un grupo de personas sin lesiones de piel compatibles con dermatitis atópica u otras manifestaciones dermatológicas inflamatorias, es decir, individuos sanos, normales (grupo control).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar el nivel plasmático de VEGF-A con el género.
- Determinar el nivel plasmático de IgE en pacientes enfermos y sanos.
- Correlacionar los niveles de VEGF-A con valores de IgE sérica en el grupo de pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio clínico, observacional, transversal y analítico. Se reclutaron 10 pacientes, que cumplieran con los criterios de DA según los criterios de Hanifin y Rajka^(1,2,3) que concurrieron al servicio de Alergia e Inmunología en el Hospital Nacional de Clínicas (HNC) de la ciudad de Córdoba; durante el periodo febrero 2014 a julio 2015. Además se seleccionaron 10 individuos sanos, sin enfermedad aparente, voluntarios que se inscribieron como grupo control.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes masculinos y femeninos de entre 16 y 85 años. Pacientes con síntomas clínicos compatibles con dermatitis atópica, asociada o no con: rinitis alérgica (asociada o no a conjuntivitis alérgica y/o sinusitis), asma (leve intermitente, leve o moderada persistente), alergia alimentaria, dermatitis de contacto.

Ausencia de ingesta de corticoides por un período mínimo de 8 semanas

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes masculinos y/o femeninos menores de 16 años y mayores de 85 años.
- Presencia de urticaria crónica idiopática en el curso del estudio.
- Consumo corticoides en un lapso menor a 8 semanas a la realización del estudio.
- Presencia de otras patologías dermatológicas durante el curso de su enfermedad (DA).
- Cirugías recientes.
- Presencia de patologías malignas, neoplasias.
- Retinopatías.
- Hepatopatía.
- Nefropatías.

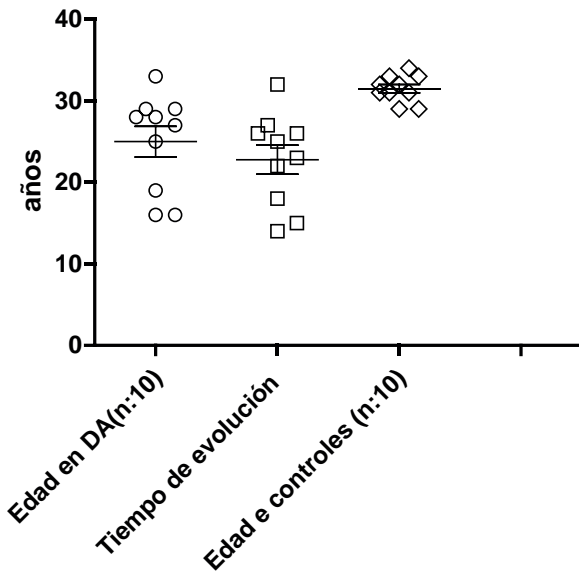


Figura 2. Edad de los pacientes con dermatitis atópica (DA) y tiempo de evolución de su enfermedad, comparado con controles normales.

- Pacientes con antecedentes de asma persistente severo o asma de difícil manejo.
- Enfermedades infecciosas agudas o crónicas durante el estudio.
- Embarazo, puerperio o lactancia durante el estudio.

VARIABLES ESTUDIADAS

Sexo, edad, antecedentes patológicos alérgicos, antecedentes familiares alérgicos, inicio de la enfermedad, sintomatología mucoso-cutánea y cualquier otro síntoma sistémico acompañante, valores de IgE sérica total, pruebas de *prick test* para aeroalérgenos y valor de VEGF tipo A sérico.

IgE total por ELISA (laboratorio Abbott); se hicieron las determinaciones siguiendo las instrucciones del laboratorio productor. La cantidad de IgE fue determinada por una curva estándar y se expresó en kU/l. El rango de detección fue entre 0,8 kU/l y 3600 kU/l. El procedimiento consiste en incubar con las muestras (estándar, controles y pacientes) partículas recubiertas de anti-IgE humana de conejo. Durante la incubación la IgE presente en el suero se une a la fase sólida. Luego de la aspiración del material no unido y del lavado, las partículas se incuban con anti-IgE humana monoclonal conjugada a peroxidasa que reacciona contra el complejo anticuerpo-IgE que recubre la partícula. La presencia de la enzima unida al complejo anticuerpo-IgE en la superficie de la partícula se detecta incubando la partícula lavada con O-feniendiamina, que contiene peróxido de hidrógeno. Durante la incubación se desarrolla un color anaranjado proporcional a la cantidad de IgE unida a las partículas. Los valores de absorción del análisis de los estándares, el control y el suero de los pacientes se objetivan en es-

pectrofotómetro a 492 nm. La curva patrón se obtiene representando gráficamente el valor de la absorción frente a la concentración de los estándares correspondientes.

Prick test, se practicó la prueba cutánea de hipersensibilidad inmediata: para alérgenos ambientales de Córdoba, Argentina: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, gramíneas, c tala, *Ambrosia*, *Amaranthus*, *Alternaria*, *Hormodendrum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Técnica: con lancetas de acero inoxidable de 1 mm (Diater Argentina). Control negativo: solución salina, diluyente para extractos alérgicos; y como control positivo: fosfato de histamina (10 mg/ml). Los procedimientos y lectura se realizaran siguiendo los criterios de la TaskForce²⁹. Se consideró prueba positiva en forma arbitraria, aquella cuya pápula era ≥ 2 mm superior al control negativo de solución fisiológica.

VEGF A: los métodos analíticos que se utilizaron para medir la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular tipo A (VEGF-A) son los siguientes:

- 1°. se realizó la extracción de sangre de acuerdo a procedimiento estándar, en condición de reposo, signos vitales normales. Se separó el suero y se conservó inmediatamente en freezer a -20°C .
- 2°. Se analizó el VEGF-A sérico. El procedimiento fue realizado mediante inmunoensayo enzimático siguiendo las instrucciones del fabricante (*Human VEGF-A Platinum*) ELISA Laboratorio Bioscience San Diego, California, USA. Las muestras de sangre se obtuvieron durante la mañana, con un período de ayuno de entre 8 y 12 horas. Fueron guardadas hasta el estudio a -40°C . Luego se procesaron en una sola vez con la misma temperatura y presión barométrica para todas las muestras. Se encubaron en paralelo el suero de los pacientes enfermos en relación 1:1 con diluyente de equipo, sueros controles sanos y muestra del estándar del VEGF-A humano, todos ellos por duplicado. Se procedió al lavado y se adicionó el anti-VEGF-A biotinilado. Luego de la incubación y lavado se agregó la streptavidina marcada con peroxidasa del rábano picante. Después de otro ciclo de incubación y lavado se adicionó el sustrato tetrametilbencidina (TMB). Luego se procedió a incubar y frenar la reacción enzimática, se desarrolló un producto coloreado cuya intensidad se relacionará con la cantidad de VEGF-A en el suero. Se graficó una curva estándar de densidad óptica (DO) media *vs* concentración de cada una de las diluciones del VEGF-A humano y se extrapoló la concentración a partir de la absorbencia media de cada muestra. La concentración se multiplicó por el factor de dilución 2. El mínimo detectable del kit es de 15 pg/ml y rango entre 15 y 960 pg/ml

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Fue aprobado por el Registro Provincial de Investigación en Salud de Córdoba (Ministerio de Salud) y por el

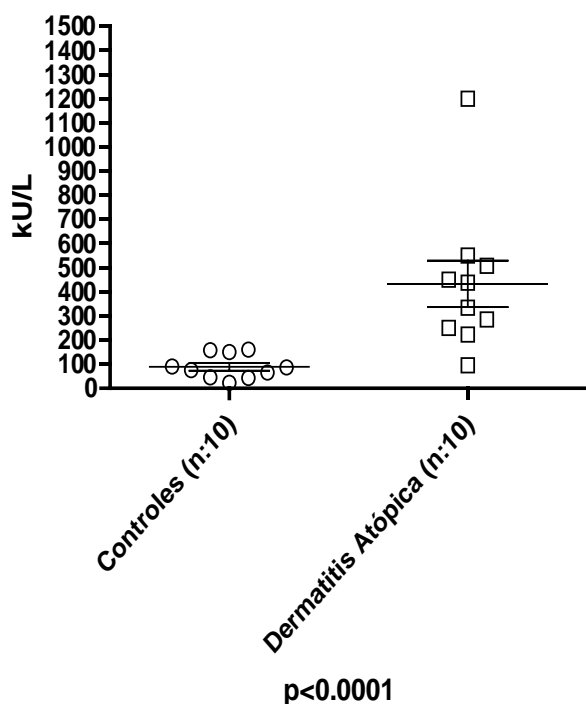


Figura 3. Niveles de IgE sérica total en dermatitis atópica y controles.

Comité de Capacitación, Docencia e Investigación y de Bioética del Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Se calcularon las medidas descriptivas para las variables de tipo cuantitativas (media, error estándar y rango) y los porcentajes para las cualitativas.

Además, para la comparación de las medias por grupos se aplicó test estadístico *t* de Student. Para el análisis entre los parámetros de VEGF-A *vs.* IgE se calculó con el método Anova Kruskal Wallis.

En todas las variables se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilks modificado.

El nivel de significancia utilizado fue de $p < 0,05$.

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico GraphPad Prisma 5.

RESULTADOS

La distribución según sexo fue 50% para cada sexo en los pacientes con dermatitis atópica y del 60% de sexo femenino y 40% masculino en el grupo control. No hubo diferencias significativas de género en ambos grupos (**Figura 1**).

Analizando la edad, en los pacientes fue de $25 \pm 5,925$ años y en el grupo control de $31,5 \pm 1,65$ años, $p = 0,0026$; la evolución fue en DA de $22,8 \pm 5,63$ años (**Figura 2**).

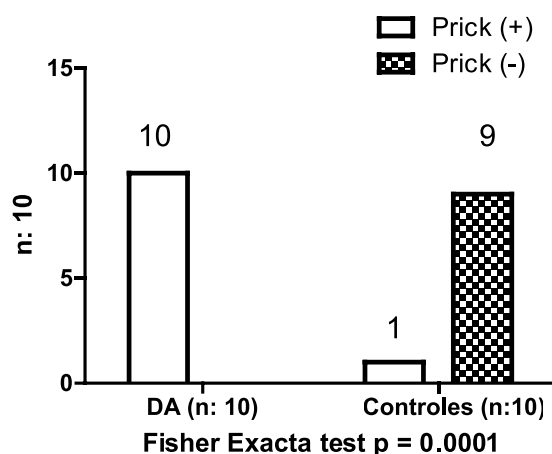


Figura 4. Prick con aeroalérgenos en pacientes con dermatitis atópica (DA) vs. controles.

ANÁLISIS DE LA IGE

Cuando se compararon los valores de IgE, en el grupo con dermatitis atópica fueron de $433,3 \pm 96,12$ kU/l (media \pm EE) y en el de los controles $89,6 \pm 15,88$ kU/l, $p = 0,0001$ (**Figura 3**).

SENSIBILIZACIÓN CON AEROALÉRGENOS

La sensibilización con aeroalérgenos fue altamente positiva en los pacientes con dermatitis atópica. Positiva 10/10 en los pacientes y solo 1/10 en los controles sanos, $p = 0,0001$ (**Figura 4**).

VEGF-A

El estudio de la determinación de VEGF A fue en DA de $196,7 \pm 63,43$ pg/ml (expresado como media \pm SE) y en controles $501 \pm 84,33$ pg/ml, $p = 0,0081$, significativa (**Figura 5**).

CORRELACIÓN ENTRE EL VEGF Y EL IGE

Se realizó una correlación entre el VEGF A e IgE sérica utilizando el método One way Anova; Kruskal Wallis con $p = 0,0003$ (**Figura 6**).

DISCUSIÓN

La angiogénesis y la vasculogénesis son reguladas principalmente por varios factores de crecimiento y sus receptores asociados (RTK: receptores tirosina quinasas). Entre ellos se encuentran el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y VEGFR (receptores VEGF) ⁽²⁶⁾. Como sabemos, el VEGF-A es esencial para muchos procesos angiogénicos de diversas causas. Nuestro estudio se focaliza en dermatitis atópica que sufren adultos y su relación con él ^(9,10,25).

La expresión génica de VEGF está regulada por una variedad de estímulos tales como la hipoxia, factores de crecimiento, la mutación p53, estrógeno, TSH (hormo-

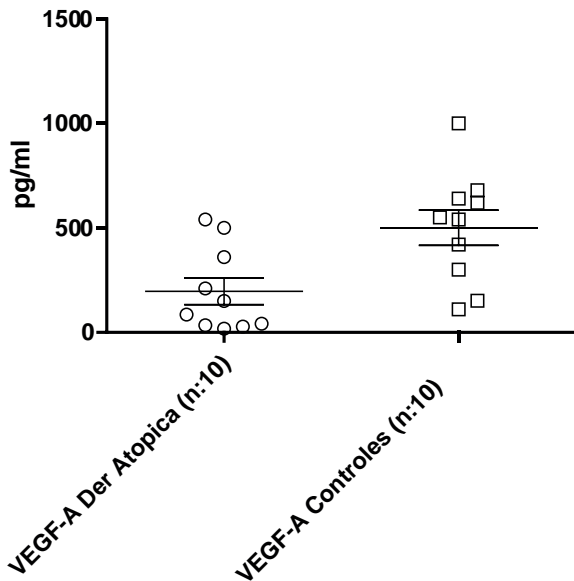


Figura 5. Niveles de VEGF A en dermatitis atópica y controles sanos, $p=0.0081$

na estimulante del tiroides), promotores tumorales, ON (óxido nítrico), obesidad, edad, respuesta alérgica, entre otros^{12,19,20,23,32}. Por ello existe una diversidad de factores que pueden influir en las variaciones de los valores del VEGF A, los cuales pueden haber influido en la muestra del grupo pacientes y controles incluidos en este trabajo. Nuestro estudio se realizó en individuos jóvenes que presentan DA desde la niñez, arrastran el proceso por un largo período de tiempo, es así que su edad era de 25 ± 5.92 años y su evolución de 22.8 ± 5.67 años. Ellos integran el grupo de los pacientes con marcha atópica y clara alteración de la filagrina, por lo tanto alteración de la barrera epitelial cutánea y respiratoria y sensibilización a áero-alérgenos comunes así como aumento de IgE en suero^{1-7,33,34}.

Así es que los niveles de IgE fueron más elevados en los pacientes con DA que en el grupo control, valor esperable puesto que forman parte de los criterios diagnósticos utilizados para clasificar a los pacientes^{1-4,8,33,34}. La sensibilización a aeroalérgenos fue positiva en todos los pacientes, y casi negativa en controles sanos, en coincidencia con lo descrito previamente^{1-4, 8,33,34}.

Es de hacer notar que nuestro grupo con DA presentaba similar proporción de paciente masculinos y femeninos, diferente a lo que se encuentra en los alérgicos en general que luego de la pubertad donde predomina el sexo femenino. Se podría explicar estos resultados por el hecho de que la dermatitis atópica se arrastra desde los primeros años de vida, donde es predominante el sexo masculino y se equilibra luego de la pubertad³⁴.

En diversos estudios de DA se ha evidenciado que el VEGFA se encuentra en concentración aumentada en

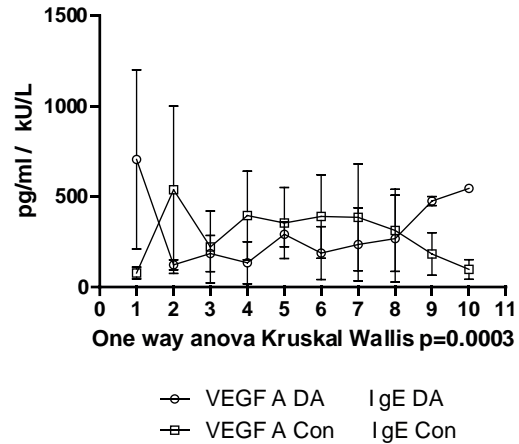


Figura 6. Niveles de VEGF A e IgE séricas en pacientes con dermatitis atópica (DA) y controles (Con).

el estrato córneo de la piel lesionada^{9,14,15,18,21,22,25,26,28}. Además, se conoce que la expresión de VEGFA está regulada positivamente en la epidermis de las dermatosis inflamatorias tales como psoriasis, dermatitis de contacto. Por los mismos se ha demostrado que el VEGF A está en gran medida en exceso en la epidermis de las lesiones de DA y esta sobreproducción resulta en la dilatación de los vasos e hiperpermeabilidad. Se observa en las lesiones típicas de la DA una dilatación prolongada de los capilares cutáneos, lo cual produce un persistente eritema y edema, aumentando el prurito y rascado cuyo efecto final es la liquenificación de la piel. Por lo tanto la DA, se torna un proceso crónico inflamatorio de la piel caracterizado por un severo prurito, eritema y edema resistente a los antihistamínicos. El VEGF A es un potente mediador que produce hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos y proliferación endotelial, por lo que estaría involucrado en el persistente edema y eritema de la dermatitis atópica^{9,14,15,18,20,21,28}.

La actividad biológica del VEGF fue corroborada por Zhang et al.²⁸, quienes demostraron la presencia en alto nivel de VEGF A en DA, 25 veces más que en el extracto córneo de la piel normal. Esto explica su efecto de hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos, hecho que se observa en la histopatología DA y que explican su rol en el persistente eritema y edema que manifiestan las lesiones de DA. Por otra parte, en estudios complementarios que realizaron estos autores encontraron que el VEGF extraído de la piel con DA, puesto como estimulante de endotelio de venas umbilicales en cultivo, su nivel era 25 veces más alto que el extraído de extracto córneo normal²⁸.

En nuestro estudio realizado en suero, no se encontró el aumento de VEGF A descrito en la piel. Además se observaron valores inferiores a los encontrados en el grupo control de nuestro estudio. Esto se explicaría por el alto y per-

sistente consumo local del VEGF A en la zona del órgano de choque; la piel, con DA, coincidente con la cronicidad de la enfermedad y a la edad de los pacientes quienes tienen muchos años de evolución de su proceso de DA. Posiblemente esto nos lleve a pensar que el VEGF A se encontraría aumentado localmente en los sitios de daño con DA. En cuanto al género, no se encontraron diferencias significativas de los valores de VEGFA.

Por último, existe correlación negativa entre los niveles aumentados de IgE sérica total y disminuidos de VEGF A en suero, si los comparamos con los individuos normales.

CONCLUSIÓN

En este trabajo no se encontró relación aumentada de VEGF-A en suero de pacientes con DA.

Ello no significaría que no esté involucrado como parte de la fisiopatología de esta enfermedad, ya que el mismo podría estar aumentado en el sitio donde se desencadena la respuesta inflamatoria, la piel.

Por otro lado, este es un número muy pequeño de pacientes (10 grupo control y 10 pacientes con DA), por lo tanto debería realizarse una muestra más grande para corroborar o rectificar los resultados encontrados ya que existen mayores evidencias de que VEGF A se encuentra elevado y jugaría un rol importante en el estrato córneo de la epidermis de los pacientes con DA.

AGRADECIMIENTO

Por su colaboración, a la Dra. Paola Ferrero (Bioquímica), y a la Dra. Macarena Elias.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Querol I Nasarre. *Dermatitis Atópica*. Rev. Pediat Aten Primaria; 2014; 11: 317-329.
2. Giachetty, Grecco, Scacchi and et al. Consenso Nacional de Dermatitis Atópica, 2013.
3. Bieber Th. Atopic Dermatitis Review. *Ann Dermatol*. 2010; 22: 127-35
4. Bieber Th. Mechanisms of Disease: Atopic Dermatitis. *New England Journal of Medicine Review* 2008; 358: 1483 -94. .
5. Bellfill RL. *Dermatitis atópica*. Tratado de Alergología; Zubeldia JM, Baeza J, Jauregui J, Senent C, editores Editorial BVB – fundación SEAC; 2012, pp 199 -206
6. Hoffjan S Stemmler S. Unravelling the complex genetic background of atopic dermatitis from genetic association results towards novel therapeutic strategies. *Arch Dermatol Res*; 2015; 307. 8: 659-670.
7. Lifschitz C. The impact of atopic dermatitis on quality of life, *Ann Nutr Metab*. 2015; 66: 34-40.
8. Hasegawa T. Abundant immunoglobulin E positive cells in skin lesions support and allergic etiology of atopic dermatitis in the early; *J EADV*; 2013; 27: 952-60.
9. Harada M, Kumemura H, Yanagimoto C, Sata M. Vascular endothelial growth factor is involved in angioedema associated with eosinophilia. *Kurume Med J*. 2005; 52: 89-91.
10. Araggen S, Ochsenbein A, Retmar. An important role of blood and lymphatic vessels in inflammation and allergy; *J Allergy (Cairo)*; 2013. doi: 10.1155/2013/672381
11. Beazley-Long N, Hua J, T Jehle, et al. VEGF-A 165 isoform b is an endogenous neuroprotective splice vascular endothelial growth factor A, live and in vitro. *J Pathol* 2013; 183: 918-9
12. Andrei G. Gunin, Vadim V. Petrov, Natalia N. Golubtzova, Olga V. Vasilieva, Natalia K. Kornilova. Age-related changes in angiogenesis in human dermis; *Experimental Gerontology*; 2014, 50: 143-151.
13. Beazley-Long N, Hua J, T Jehle, et al. VEGF-A 165 isoform B is an endogenous neuroprotective splice vascular endothelial growth factor A live and in vitro. *J Pathol* 2013; 183: 918-9
14. Koczy-Baron E, Jochem J et al. Increased plasma concentration of vascular endothelial growth factor in patients with atopic dermatitis and its relation to disease severity and platelet activation *Inflamm. Resp*. 2012; 61:1405-1409.
15. Genovese A, Detoraki A, Granta F, et al. The angiogenesis, atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy*. 2012; 96:50-60. 2012; 96: 50-60.
16. Groneberg DA, Bester C, Grützkau A, Serowka F, Fischer A, Henz BM, Welker P. C. Mast cells and vasculature in atopic dermatitis potential stimulus of angiogenesis. *Allergy*. 2005; 60: 90-97.
17. Hang A, Matsuo H, Morita E. Increased production of vascular endothelial growth factor in lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 2006; 297: 425-429.
18. Kay, A.B. Calcitonin gene-related peptide- and vascular endothelial growth factor-positive inflammatory cells in late-phase allergic skin reactions in atopic subjects; *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; Vol. 127: 232 – 237.
19. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulations of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*. 2000; 19:5598-605.
20. Ruggiero D, Dalmaso C, Nutile T, Sorice R, Dionisi L, et al. Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms. *PLoS One*. 2011 Feb 6:e16982. doi: 10.1371/journal.pone.0016982 2011; 6.
21. Pennock S and Kazlauskas A. Vascular Endothelial Growth Factor A Competitively Inhibits Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-Dependent Activation of PDGF Receptor and Subsequent Signaling Events and Cellular Responses. *Molecular and Cellular Biology*, 2016: 36:2314-27.
22. Samochocki, Z.; Bogaczewicz, J.; Sysa-Jedrzejowska, A.; McCauliffe, D.P.; Kontny, E.; Wozniacka, A. Expression of vascular endothelial growth factor and other cytokines in atopic dermatitis, and correlation with clinical features. *Rev. International Journal of Dermatology* 2016. 55: 141 – 6.
23. Busse S, Steiner J, Justus Michel J, Dobrowolny H, Mawrin Ch.; Age-related increase of VGF-expression in T lymphocytes. *AGING, (Albany)* 2014; 440 – 53
24. Harper S J, Bates D O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? . *Nat Rev Cancer*; 2008 8: 880-887.
25. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF) /VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions; *Clinical Science*; 2005;109:227-241.
26. Amarbayasgalan T, Takahashi H, Dekio I, Morita E. Content of Vascular Endothelial Growth Factor in Stratum Corneum Well

- Correlates to Local Severity of Acute Inflammation in Patients with Atopic Dermatitis; *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;157: 251–258.
27. Vempati P, Popel A, Gabhann F. et al. Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews.*2014; 25:1–19.
 28. Zhang Y, Matsuo H, Morita E. Increased production of vascular endothelial growth factor in the lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 2006; 297: 425–429.
 29. Bernstein IL1, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R, Sicherer S, Golden DB, Khan DA, Nicklas RA, Portnoy JM, Blessing-Moore J, Cox L, Lang DM, Oppenheimer J, Randolph CC, Schuller DE, Tilles SA, Wallace DV, Levetin E, Weber R; American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; American College of Allergy, Asthma and Immunology. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008 Mar; 100(3 Suppl 3):S1-148.
 30. Fonacier L. A Practical Guide to Patch Testing. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015; 3: 669-75.
 31. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, Cox L, Demoly P, Frew AJ, O’Hehir R, Kleine-Tebbe J, Muraro A, Lack G, Larenas D, Levin M, Nelson H, Pawankar R, Pfaar O, van Ree R, Sampson H, Santos AF, Du Toit G, Werfel T, Gerth van Wijk R, Zhang L, Akdis CA.. International consensus on allergy immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136:556-68
 32. Juárez CP, Muiño JC, Guglielmo H, Sambuelli R, Echenique JR, Hernández M, Luna JD. Experimental retinopathy of prematurity: Angiostatic inhibition by nimodipine, ginkgo-biloba, and dipyridamole, and response to different growth factors. *Eur J Ophthalmol.* 2000; 10: 51-9.
 33. Boguniewicz M, Leung DYM, Atopic Dermatitis. *Middleton’s Allergy Principles and Practice*, 8° Edition. Edited by Adkinson F et al. Elsevier. Philadelphia, 2014. pp 540 – 564.