

# FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL TIPO A EN URTICARIA CRÓNICA

## Endothelial growth factor type A in chronic urticaria

Macarena Elías<sup>1</sup>, Gloria Dozo<sup>2</sup>, Paola Ferrero<sup>3</sup>, Juan C. Muiño<sup>4</sup>

### RESUMEN

Antecedentes. La urticaria crónica espontánea (CSU) es una enfermedad que afecta al 1,4% de la población mundial, siendo el 45% de causa autoinmune. Su fisiopatogenia aún no ha sido bien establecida.

El VEGF actúa como citoquina proinflamatoria, y puede ser secretada por eosinófilos. Su isoforma VEGF-A es un potente mediador involucrado en el aumento de permeabilidad vascular y angiogénesis relacionados en la inflamación y cáncer. Se han realizado estudios que vinculan VEGF y CSU pero con limitados criterios de exclusión y sin discriminar isoformas.

Objetivo. Comparar los niveles séricos de VEGF-A en CSU, discriminando su comportamiento entre autoinmune (ASST+) y no autoinmune (ASST-). Vincular VEGF-A a los niveles de eosinófilos sanguíneos de los grupos de estudio. Métodos. Diez pacientes con diagnóstico de CSU y 7 controles sanos. Se realizó test intradérmico de suero autólogo (ASST), se midieron eosinófilos en sangre y se analizó VEGF-A sérico por ELISA en cada grupo de estudio.

Resultados. El ASST resultó positivo en el 60% de los pacientes con CSU. Los niveles de VEGF A fueron más elevados en controles que en pacientes siendo significativamente menor en ASST+. Los niveles de eosinófilos en sangre periférica fueron significativamente más altos en CSU vs controles. Se halló una correlación inversa entre los niveles séricos de VEGF-A y el número absoluto de eosinófilos en los CSU.

Conclusión: El VEGF-A no se encuentra elevado en el suero de pacientes con CSU, y su concentración sérica tiene una relación inversamente proporcional con el número de eosinófilos en sangre periférica.

**Palabras claves:** urticaria crónica espontánea, factor de crecimiento endotelial tipo A

### ABSTRACT

Rationale: Spontaneous chronic hives (CSU) is a disease that affects 1.4% of the world's population, with 45% of autoimmune causes. Its physiopathogenia has not yet been well established. VEGF acts as a pro-inflammatory cytokine, and can be secreted by eosinophils. Its Isoform VEGF-A is a powerful mediator involved in increasing vascular permeability and related angiogenesis in inflammation and cancer. Studies have been conducted linking VEGF and CSU but with limited exclusion criteria and without discriminating isoforms.

Objective: It was to compare serum levels of VEGF-A in CSU, discriminating against its behavior between autoimmune (ASST+) and non-autoimmune (ASST-). Link VEGF-A to blood eosinophil levels in the study groups.

Methods: Ten patients diagnosed with CSU and 7 healthy controls. Autologous Serum Intradermic Test (ASST) was performed, eosinophils were measured in the blood and serum VEGF-A was analyzed by ELISA in each study group.

Results: ASST tested positive in 60% of patients with CSU. VEGF A levels were higher in controls than in patients being significantly lower in ASST+ peripheral blood eosinophil levels were significantly higher in CSU vs controls An inverse correlation was found between serum LEVELS of VEGF-A and the absolute number of eosinophils in CSU Conclusion: VEGF-A is not high in the serum of CSU patients, and its serum concentration has an inversely proportional relationship with the number of eosinophils in peripheral blood

**Key words:** endothelial growth factor type A, chronic urticaria

ARCHIVOS DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2020;51(1):033-038

## INTRODUCCIÓN

La urticaria crónica es una enfermedad que afecta al 1,4% de la población mundial y 1,5% en Latinoamérica<sup>1</sup>; el 45% es de causa autoinmune. Se caracteriza por la aparición de un exantema maculopapular eritematoso pruriginoso que dura más de seis semanas. En el 40-50% de los casos suele acompañarse de angioedema. Compromete notablemente la calidad de vida y resulta una gran carga socioeconómica debido a la reducción en el rendimiento individual<sup>1-5</sup>.

En un gran número de pacientes no se encuentra una causa que induce la reacción y se la llama urticaria crónica espontánea (CSU)<sup>1-3</sup>. Dentro de esta patología existe un grupo de pacientes que generan anticuerpos de tipo IgG contra la subunidad alfa del receptor de alta afinidad de la IgE y, en menor medida, anticuerpos IgG anti-IgE, otorgando el nombre de urticaria autoinmune (AU). La positividad del test intradérmico de suero autólogo (ASST) es un fuerte indicador de AU y es utilizado en su diagnóstico<sup>10</sup>.

Estudios recientes han sugerido un papel importante de diversas citoquinas y mediadores proinflamatorios

1. Ex residente Servicio Cátedra de Alergia e Inmunología. Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

2. Profesora Asociada de Alergia e Inmunología UAMIHNC, Jefe de Servicio de Alergia e Inmunología, Hospital Nacional de Clínicas, Fac Cs Méd UNC. Directora Centro Formador de la especialidad Alergia e Inmunología y Directora Académica de la especialidad Alergia e Inmunología. Sec Graduados en Cs De La Salud Fac Cs Med Unc

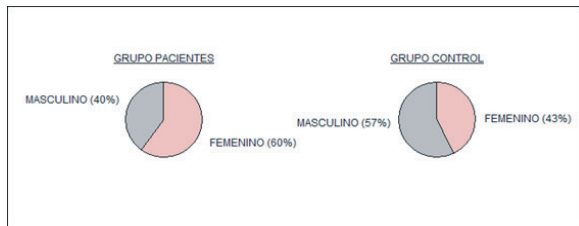
3. Bioquímica Especialista en Inmunología, Jefa de Servicio Laboratorio de Inmunología Hospital Nacional de Clínicas, Fac Cs Med Unc

4. Director Centro Formador de la AAAeI de Córdoba. Presidente del Comité de la Especialidad Alergia e Inmunología, Consejo de Médicos de la Provincia de Córdoba. Especialista en Alergia e Inmunología. Especialista en Medicina Interna

Correspondencia: secretaria@aaaec.org.ar.

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

Recibido: 11/11/2019 | Aceptado: 30/03/2020



**Figura 1.** Distribución de sexo entre pacientes con CSU y controles,  $p=0,08$ , NS

en la fisiopatogenia de la CSU, pero aún no ha sido bien establecido<sup>6-9</sup>.

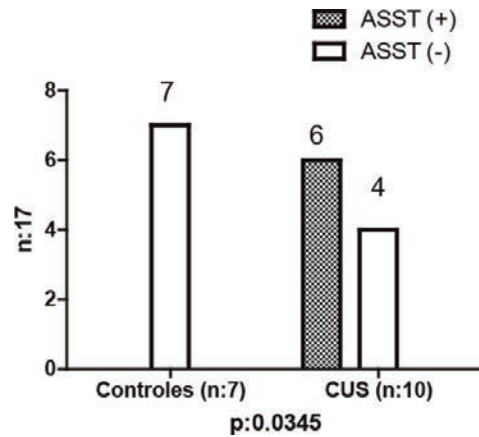
El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y su familia de receptores son reguladores esenciales de la angiogénesis y la permeabilidad vascular<sup>10,11</sup>.

Actualmente se conocen dentro de la familia de estas citoquinas a VEGF-A, factor de crecimiento placentario (PGF), VEGF- B, VEGF- C y VEGF-D. El VEGF-A se encuentra principalmente elevado en procesos inflamatorios y en el cáncer<sup>11</sup>.

Este factor está regulado por el gen localizado en el cromosoma 6p 21.1, el cual traduce

un número de isoformas de empalme, dentro de las cuales, las más notables en los seres humanos son VEGF121, VEGF165 y VEGF189. Estas isoformas tienen diferencias en las propiedades bioquímicas tales como sus afinidades para los receptores de VEGF y proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs), dando diferentes efectos sobre el crecimiento de los vasos y el aumento de la permeabilidad vascular. Los receptores primarios de tirosinquinasa (RTK) para las isoformas del VEGF son VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1 o KDR), y VEGFR3 (Flt-4). La unión del receptor de VEGF depende de la presencia de correceptores selectivos de isoformas tales como NRP1, NRP2, y de los glicosaminoglicanos (GAGs) de la superficie celular<sup>11</sup>.

No se ha estudiado aún la función de estas isoformas en la Urticaria Crónica, como en otras patologías. En condiciones normales, isoformas de VEGF-A están diferencialmente sequestradas por proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) en la matriz extracelular (ECM) y sujetas a diversos inhibidores del VEGF, por ejemplo, sVEGFR1 (isoforma secretada por el receptor de membrana VEGFR1). Estos inhibidores están involucrados en el establecimiento de la quiescencia vascular. Durante la inflamación y la tumorigénesis, el VEGF



**Figura 2.** Prueba ASST+ y - en CSU y controles normales.  $\chi^2$   $p=0,0345$

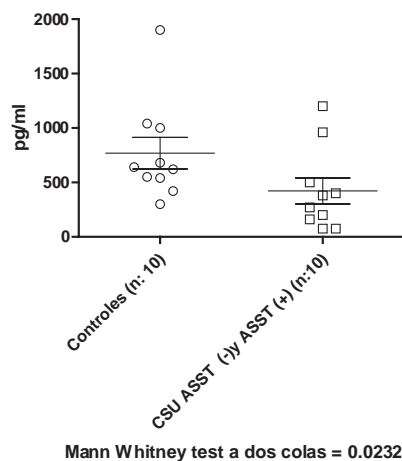
sequestrado puede ser liberado por las proteasas, tales como la metaloproteinasas de la matriz zinc dependiente (MMPs), como por ejemplo la MMP tipo 9 presente en la membrana de varias células, entre ellas, el eosinófilo<sup>11</sup>.

En piel se encuentra fuertemente expresado por los queratinocitos durante la cicatrización de las heridas y en psoriasis, en donde existe un notorio aumento microvascular de la permeabilidad y la angiogénesis<sup>10</sup>. VEGF-A es una glicoproteína de unión a heparina, secretada como un homodímero de 45 kDa por muchos tipos de células diferentes. VEGF-A también provoca la vasodilatación a través de la vía de óxido nítrico sintetasa en las células endoteliales y puede activar la migración de leucocitos<sup>11</sup>.

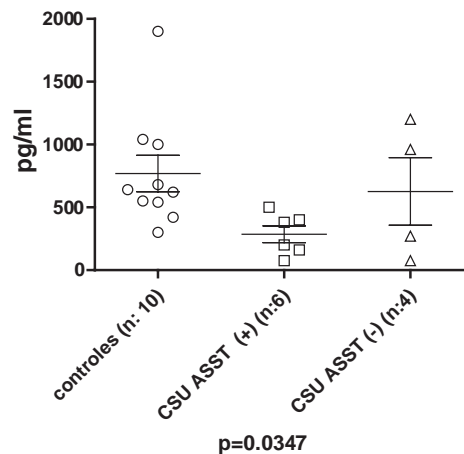
Numerosos estudios lo consideran un mediador involucrado en la fisiopatogenia de distintas patologías como el cáncer, procesos isquémicos, neuropatías, hepatopatías, asma, obesidad, entre otros procesos inflamatorios<sup>10</sup>. El VEGF actúa como una citoquina proinflamatoria, y se ha descrito que puede ser secretada por eosinófilos, pero lo que no se encuentra definido es su asociación en el contexto de la CSU.

Los trabajos presentados sobre VEGF son escasos y se contraponen en sus conclusiones. Además, no se han considerado dentro de los criterios de exclusión, a distintas patologías o procesos que también generan aumentos de VEGF, favoreciendo la sobrevaloración y generación de sesgos en la investigación<sup>6-9</sup>.

No conocemos que en la literatura médica actual se haya estudiado la subclase A de VEGF y su asociación con la CSU. Decidimos estudiar la asociación entre VEGF-A y la CSU para aportar datos a los mecanismos fisiopatogénicos, discriminar la relación con el subtipo A de VEGF, y estimular o promover futuras investigaciones para ofrecer una alternativa terapéutica.



**Figura 3.** Niveles séricos de VEGF-A (pg/ml) en los grupos pacientes con CSU y control.



**Figura 4.** Niveles séricos de VEGF A en pacientes con urticaria crónica de causa autoinmune y no autoinmune comparada con controles ( $p=0,0347$  - ANOVA Kruskal Wallis).

## OBJETIVO GENERAL

- Establecer la relación entre la CSU y el VEGF-A.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar los niveles séricos de VEGF-A en pacientes y controles.
- Comparar los niveles séricos de VEGF-A entre pacientes AAST+ y ASST-
- Correlacionar el recuento absoluto de eosinófilos en sangre periférica con niveles séricos de VEGF-A en los grupos de estudio.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Tipo de Estudio.** Observacional, transversal y analítico.

**Grupo de Estudio.** Se conformaron dos grupos:

- Pacientes:** Se seleccionaron diez pacientes entre 18 y 57 años que consultaron al Servicio de Alergia e Inmunología del Hospital Nacional de Clínicas por Urticaria Crónica Espontánea.
- Controles:** Se eligieron 7 personas sanas de la provincia de Córdoba con similares características demográficas que el grupo de estudio.

### Criterios de Inclusión:

- Pacientes:** Pacientes con diagnóstico de CSU.

### Criterios de Exclusión en ambos grupos:

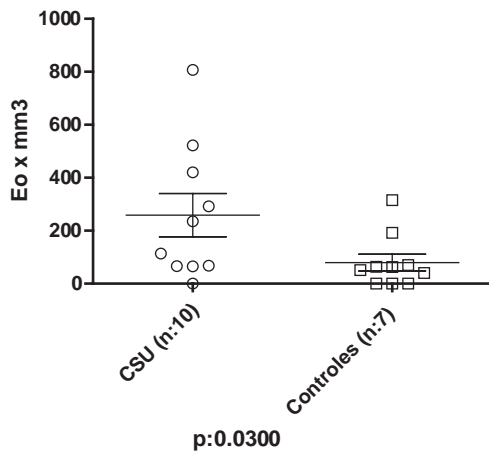
Antecedentes personales fisiológicos de:

- Índice de masa corporal (IMC) >30
- Embarazo, puerperio, lactancia.
- Antecedentes personales patológicos de:

- Urticaria aguda, crónica física, urticaria vasculitis, por medicamentos, alimentos, insectos.
- Patologías inflamatorias de curso crónico como asma, EPOC, artritis, lupus, dermatitis, psoriasis.
- Procesos isquémicos como accidentes cerebro vasculares (ACV), Infarto Agudo de Miocardio (IAM), angina estable, trombosis venosa profunda (TVP), trombo embolismo pulmonar (TEP).
- Hepatopatías,
- Retinopatías.
- Nefropatías.
- Neuropatías degenerativas,
- Infecciones en curso (agudas o crónicas),
- Traumatismos o cirugías recientes.
- Neoplasias.

**Evaluación de pacientes:** Se confeccionó una historia clínica en la que se incluyó un interrogatorio sobre sintomatología mucocutánea, y cualquier otro síntoma sistémico acompañante. Se solicitó hemograma, glucemia, eritrosedimentación, dosaje de anticuerpos, complementemia, análisis de orina, serología (VHB AgS, anti-VHC, VDRL, *Helicobacter pylori* y otras según clínica y/o epidemiología), coproparasitológico, perfil tiroideo (TSH, T4 libre, ATPO), función renal y hepática. Se realizaron pruebas de test cutáneos para alimentos y aeroalérgenos (todos ellos negativos o normales).

A todos los pacientes con CSU se les realizó el test intradérmico de suero autólogo (ASST) para evaluar el estado autoinmune de la enfermedad. En esta prueba cutánea intradérmica se aplicó 0,05 ml de suero fresco autólogo intradérmico con control positivo y negativo. Al paciente se le indicó suspender la ingesta de antihistamínicos dos se-



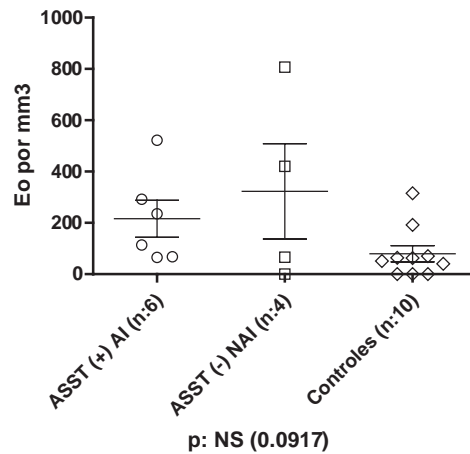
**Figura 5.** Niveles de eosinófilos en sangre periférica por mm<sup>3</sup> en CSU y controles; p=0,0300.

manas previas como se describe en *EAACI/GA(2)LEN: task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria*<sup>5</sup>. En quienes el ASST resultó positivo fueron diagnosticados como urticaria autoinmune (ASST+).

**Muestras.** 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.

**Determinación de VEGF-A:** Se analizó VEGF-A sérico mediante inmunoensayo enzimático siguiendo las instrucciones del fabricante (*Human VEGF-A Platinum*) ELISA Laboratorio eBioscience San Diego, California, USA. El VEGF-A sérico fue dosado de acuerdo a instrucciones del fabricante. Brevemente se incubaron 7 diluciones del Standard VEGF-A humano y el suero del paciente en relación 1:1 con diluyente de muestra, por duplicado. Se lavó 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 agregó el sustrato tetrametilbencidina (TMB). Luego de incubar y frenar la reacción enzimática se desarrolló un producto coloreado cuya intensidad se relaciona a la cantidad de VEGF-A en el suero. Se grafica una curva estándar de densidad óptica (DO) media *vs.* concentración de cada una de las 7 diluciones del VEGF-A humano y se extrapola la concentración a partir de la absorbencia media de cada muestra. La concentración se multiplica por el factor de dilución 2.

**Consideraciones éticas.** Este trabajo ha sido sometido a consideración y aprobado por el Comité de capacitación y Docencia del Servicio de Alergia e Inmunología



**Figura 6.** Niveles de eosinófilos según etiología en paciente con ASST+, ASST- vs controles, p=0,0917 NS (ANOVA Kruskal Wallis).

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

**Análisis Estadístico.** Las variables demográficas se compararon entre pacientes y grupo control con los tests de Mann-Whitney para la edad y exacto de Fisher para el sexo. La comparación de VEGF-A sérico entre grupo control y pacientes con CSU se realizó mediante test no paramétrico de Mann-Whitney a dos colas. Anova - Kruskal Wallis fue utilizado para comparar los niveles de VEGF-A entre controles, pacientes con ASST- y ASST+ (Grafpad Prism 7). La correlación entre los niveles séricos de VEGF-A y el valor absoluto de eosinófilos en sangre se realizó mediante test de correlación no-paramétrico de Spearman (Infostat). Se consideró significativo un p<0,05.

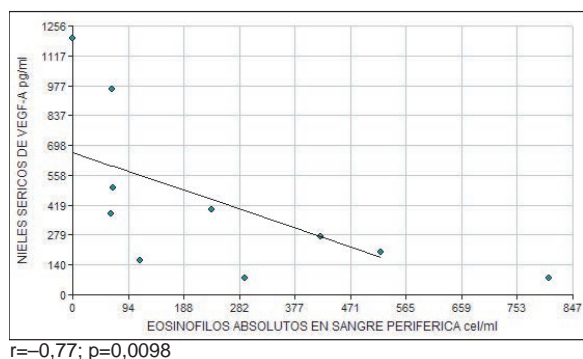
## RESULTADOS:

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio en cuanto a las variables demográficas. Con respecto a edad, la mediana etaria fue de 33 años (P<sub>25-75</sub>: 29-46) en los controles y de 43,5 años (P<sub>25-75</sub>: 38-52) en los pacientes (p=0,08). En la **Figura 1** se observa que el 40% de los pacientes y el 57% de los controles fueron de género masculino (p=0,64).

El test intradérmico de suero autólogo (ASST) resultó positivo en el 60% de los pacientes con CSU (**Figura 2**).

Los niveles de VEGF A se presentaron más elevados en controles que en pacientes CSU (769±145,1 pg/ml *vs.* 422,2±119,4; p=0.0232) (**Figura 3**).

Los niveles séricos de VEGF A se presentaron más elevados en los controles (769± 145,1 pg/ml) y CSU ASST- (626,5±269,3 pg/ml), pero diferentes ambos de lo hallado en CSU ASST+ (286±67,08 pg/ml; p=0,0347) (**Figura 4**).



**Figura 7.** Gráfico de correlación entre niveles de VEGF-A (pg/ml) y los niveles de eosinófilos absolutos en sangre periférica (cel/ml) en grupo pacientes con CSU.

Los niveles de eosinófilos en sangre periférica fueron significativamente más altos en CSU *vs.* controles ( $258,9 \pm 81,41$  por  $\text{mm}^3$  *vs.*  $79,5 \pm 31,63$  por  $\text{mm}^3$ ; test T Mann Whitney;  $p=0,0300$ ) (**Figura 5**).

Separando los niveles de eosinófilos en las CSU encontramos que el grupo ASST+ fue de  $216 \pm 71,85$  por  $\text{mm}^3$ , siendo levemente inferior a CSU ASST-,  $323 \pm 185,8$  por  $\text{mm}^3$ . Los valores en los controles fueron significativamente bajos  $79,5 \pm 31,63$  por  $\text{mm}^3$  ( $p = 0,0917$ ) (**Figura 69**).

Se halló una correlación inversa entre los niveles séricos de VEGF-A y el número absoluto de eosinófilos en los pacientes con CSU ( $r=-0,77$ ;  $p=0,0098$ ), mientras que en el grupo control se hallaron los siguientes valores:  $r=0,59$ ;  $p=0,1605$ . (**Figura 7**).

## DISCUSIÓN

La regulación de VEGF-A es fundamental para la neovascularización y aumento de permeabilidad de tejidos en condiciones fisiológicas y patológicas, lo que justifica los numerosos criterios de exclusión con el consecuente bajo número de muestras en este estudio.

En nuestros resultados observamos que los niveles séricos de VEGF-A no presentan diferencias significativas en pacientes con CSU cuando son comparados con los controles, pero se encuentra una diferencia significativamente menor de VEGF-A en CSU ASST+ que en CSU ASST- y controles. Estas observaciones no concuerdan con aquellas formuladas por Tedeschi et al.<sup>6</sup>, que informó que los niveles de VEGF en plasma aumentan en pacientes con CSU posiblemente como consecuencia de una sobreexpresión por los eosinófilos en piel lesionada. Muchos mecanismos posibles o factores pueden ser responsables de los resultados, aquí revelados. En primer lugar, los traba-

jos publicados carecen de criterios de exclusión necesarios para evitar sesgos en la investigación. En segundo lugar, los trabajos de Tedeschi et al.<sup>6</sup> como también los de Chandrashekar et al.<sup>7</sup> midieron los valores de VEGF en plasma, mientras Metz et al.<sup>8</sup> al igual que nosotros lo hicieron en suero.

En nuestro estudio, observamos que el recuento absoluto de eosinófilos en sangre periférica tiende a correlacionarse de forma inversamente proporcional con los niveles de VEGF-A en suero. Esto nos lleva a varias posibles hipótesis, por ejemplo: Primera hipótesis: los eosinófilos actuarían como inhibidores en suero mediante la liberación de mediadores inmunorreguladores de su secreción. Esto indicaría que los eosinófilos serían la principal fuente de secuestro del suero del VEGF-A, en el contexto de la CSU. La segunda hipótesis podría fundamentarse en que se sabe que secuestrado el VEGF-A por células endoteliales ejerce una función haptotáctica, que permite su migración y extienden filopodios para explorar sitios del VEGF depositado; por ello es probable que en sangre periférica el VEGF-A comparta esta función y sea secuestrado por los eosinófilos circulantes, permitiendo su migración hacia la piel. Así lo menciona Kay et al., cuando describe una sobreexpresión de VEGF en biopsia de piel afectada en pacientes con CSU<sup>9</sup>, complementando a su estudio previo donde observaron eosinófilos VEGF+, neutrófilos y macrófagos CD68+ en biopsias tomadas 6 horas después del desafío inducido por alérgenos como modelo de CSU<sup>14</sup>.

Cuando Tedeschi et al.<sup>6</sup> realizan una correlación entre eosinófilos y valores plasmáticos de VEGF lo hace a partir del recuento de eosinófilos reclutados en biopsia de piel, encontrando una correlación directamente proporcional. En los casos de eosinopenia en urticaria crónica, es un signo de empeoramiento de las formas crónicas autoinmunes<sup>13</sup> y si asociamos que cuanto menor es el número de eosinófilos en sangre mayor es el valor de VEGF-A sérica, podríamos suponer que altos niveles de VEGF-A podrían vincularse con pacientes de mala respuesta a tratamientos actuales.

Nuestro análisis permite concluir en este estudio que VEGF-A no es útil como biomarcador de urticaria crónica en suero, aunque sería de gran utilidad ampliar el número de casos y controles, ya que una limitación de nuestro estudio fue el pequeño tamaño de la muestra, compuesta por 17 sujetos.

## CONCLUSIÓN

El VEGF-A no se encuentra elevado en el suero de pacientes con CSU, y su concentración sérica en estos pacientes tiene una relación inversamente proporcional al número de eosinófilos en sangre periférica.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Fricke J, Ávila G, Keller T, et al. Prevalence of chronic urticaria in children and adults across the globe: Systematic review with meta-analysis. *Allergy*. 2020; 75(2):423-32.
2. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, et al. The EAACI/GA2LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. The 2017 revision and update. *Allergy* 2018;73(7):1393-414.
3. Kaplan AP. Urticaria and Angioedema. In: Adkinson NF, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FER, Lemanske RF, editors. *Middleton's Allergy. Principles & Practice*. Seventh edition. Philadelphia: Mosby; 2008. p 1063-81.
4. Kaplan AP. Therapy of chronic urticaria: a simple, modern approach. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014;112: 419-25.
5. Konstantinou GN, Asero R, Maurer, et al. EAACI/GA(2)LEN: task force consensus report: the autologous serum skin test in urticaria. *Allergy* 2009; 64(9):1256-68.
6. Tedeschi A, Asero R, Marzano AV, et al. Plasma levels and skin-eosinophil-expression of vascular endothelial growth factor in patients with chronic urticaria. *Allergy* 2009;64:1616-22.
7. Chandrashekar L, Rajappa M, Sundar I, et al.. Vascular endothelial growth factor levels in patients with chronic urticaria. *Clinica Chimica Acta*.2013;422: 44–46.
8. Metz M, Krull C, Maurer M. Histamine, TNF, C5a, IL-6, -9, -18, -31, -33, TSLP, Neopterin, and VEGF are not elevated in chronic spontaneous urticaria. *Clinica Chimica Acta*. 2013;422:44-6.
9. Kay A, Ying S, Ardelean E, et al. Calcitonin gene-related peptide and vascular endothelial growth factor are expressed in lesional but not uninvolved skin in chronic spontaneous urticaria. *Clinical & Experimental Allergy* 2014;44:1053-60.
10. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (vegf)/Vegf receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science*. 2005;109:227-41.
11. 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.
12. Asero R, Tedeschi A, Cugno M. Treatment of Refractory Chronic Urticaria: Current and Future Therapeutic Options. *Am J Clin Dermatol* 2013;14:481-8.
13. Kolkhir P, Churcch M, Altricher S, et al. Eosinopenia, in Chronic spontaneous Urticaria, Is associated with High Disease activity Autoimmunity and Poor Response to treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8:318-25.
14. Kay AB. Calcitonin gene-related peptide- and vascular endothelial growth factor-positive inflammatory cells in late-phase allergic skin reactions in atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:232-7.
15. Powell RJ, Du Toit GL, Siddique N, et al. BSACI guidelines for the management of chronic urticaria and angioedema. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:631-50.
16. Ortonne JP. Chronic urticaria: a comparison of management guidelines. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*.2011;12(17):2683-93.
17. Saini SS. Chronic spontaneous urticaria, etiology and pathogenesis. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2014;34:33-52.
18. Greaves MW. Pathology and Classification of Urticaria. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2014;34:1-9.
19. Posthumus J, Tiñana A, Mozena JD, et al. Autoimmune mechanisms in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 2012:814-6.
20. Magen E, Mishal J, Schlesinger M. Clinical and laboratory features of chronic idiopathic urticaria in the elderly. *International Journal of Dermatology*. 2013;52: 1387–91.
21. Najib U, Sheikh J. The spectrum of chronic urticaria. *Allergy Asthma Proc*. 2009;30:1-10.
22. Harada M, Kumemura H, Yanagimoto C, Sata M. Vascular endothelial growth factor is involved in angioedema associated with eosinophilia. *Kurume Medical Journal*. 2005;52:89-91.
23. Norrby, Klas. Mast cells and angiogenesis. *Apmis* 2002;110:355–71.
24. Puxeddu I, Alian A, Piliponsky AM, Ribatti D, Panet A, Levi-Schaffer F. Human peripheral blood eosinophils induce angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37: 628–36.
25. Bernstein D, Blessing-Moore J, Cox L, et al. The diagnosis and management of acute and chronic urticaria: 2014 update. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1270-77.
26. Kasperska-Zajac A, Grzanka A, Machura E, et al. Analysis of procalcitonin and CRP concentrations in serum of patients with chronic spontaneous urticaria. *Inflamm Res*. 2013; 62:309–312.
27. Valero A, Herdman M, Bartra J, et al. Adaptation and Validation of the Spanish Version of the Chronic Urticaria Quality of Life Questionnaire (CU-Q2oL). *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(6):426-32.
28. Chandrashekar L, Rajappa M, Sundar I, et al. Platelet activation in chronic urticaria and its correlation with disease severity. *Platelets*.2014;25(3):162-5.
29. Sarrazini S, Lamanna WC, Esko J D. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3:1-33.
30. Kessel A, Bishara R, Amital A, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are associated with the severity of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:221-5.
31. Staumont-Salle D, Dombrowicz D, Caprón M, Delaporte E. Eosinophils and Urticaria. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*.2006;30:13-28.
32. Ruggiero D, Dalmaso C, Nutile T, et al. Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms. *PLoS ONE*. 2011;6(2): e16982. doi:10.1371/journal.pone.0016982.