

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO, TRANSDÉRMICO E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE CAULES E FOLHAS DE *COMBRETUM RUPICOLA*

EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND TRANSDERMAL POTENTIAL AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF METHANOLIC EXTRACTS OF COMBRETUM RUPICOLA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO, TRANSDÉRMICO Y DEL PERFIL FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE COMBRETUM RUPICOLA

Gabriel Cristovão Campos

E-mail: gabriel.cristovao@mail.edu.uft.br

Sérgio Ascêncio Donizetti

E-mail: sergioda@mail.uft.edu.br

Samara Kelly Amaral Barro

E-mail: aramasly@mail.uft.edu.br

ABSTRACT:

The genus *Combretum* (Combretaceae) includes several species traditionally used in folk medicine and reported as sources of bioactive compounds with anti-inflammatory potential. However, the species *Combretum rupicola* remains poorly studied. This study aimed to extract chemical constituents from *C. rupicola* leaves, qualitatively identify the presence of flavonoids, and evaluate, through *in silico* simulations, the interaction of characteristic compounds from the family with inflammatory molecular targets. Leaves were collected at IFTO–Araguatins Campus, processed, extracted by ultrasound using an acetonitrile/methanol (80:20) solution, and the extract was subsequently lyophilized. Phytochemical screening confirmed the presence of flavonoids, especially quercitrin. For the *in silico* study, ligands described in Combretaceae were selected, including quercitrin, kaempferol, betulinic acid, combretol, rhamnazin, and combretastatin A-4. The proteins COX-2, NLRP3, P38, TNF, and CXCR4 were used as targets, and docking experiments were carried out using AutoDock 4.2. The results showed favorable interactions between ligands and the active sites of the proteins, with emphasis on quercitrin and combretastatin, which displayed binding energies comparable to or higher than reference inhibitors. These findings suggest that *C. rupicola* is a promising source of compounds with anti-inflammatory potential, supporting further experimental investigations.

KEYWORDS: *Combretum rupicola*; flavonoids; molecular docking; inflammation; natural inhibitors.

RESUMO:

O gênero *Combretum* (Combretaceae) possui diversas espécies empregadas na medicina tradicional, sendo reportado como fonte de compostos bioativos com potencial anti-inflamatório. Contudo, a espécie *Combretum rupicola* ainda carece de estudos aprofundados. O presente trabalho teve como objetivo realizar a extração de constituintes químicos das folhas de *C. rupicola*, identificar qualitativamente a presença de flavonoides e avaliar, por meio de simulações *in silico*, a interação de compostos característicos da família com alvos moleculares inflamatórios. As folhas foram coletadas no IFTO–Campus Araguatins, processadas, extraídas por ultrassom em solução de acetonitrila e metanol (80:20), e o extrato obtido foi liofilizado. Ensaios fitoquímicos confirmaram a presença de flavonoides, com destaque para a quercitrina. Para o estudo *in silico*, foram selecionados ligantes descritos na Combretaceae, como quercitrina, kaempferol, ácido betulínico, combretol, rhamnazin e combretastatina A-4. As proteínas COX-2, NLRP3, P38, TNF e CXCR4 foram utilizadas como alvos, e os experimentos de docking foram conduzidos no AutoDock 4.2. Os resultados indicaram interações favoráveis entre os ligantes e os sítios ativos das proteínas, com destaque para a quercitrina e a combretastatina, que apresentaram energias de ligação comparáveis ou superiores às dos inibidores de referência. Esses achados sugerem que *C. rupicola* representa uma fonte promissora de compostos com potencial anti-inflamatório, justificando futuras investigações experimentais.

PALAVRAS-CHAVE: *Combretum rupicola*; flavonoides; docking molecular; inflamação; inibidores naturais.

RESUMEN:

El género *Combretum* (Combretaceae) incluye diversas especies utilizadas en la medicina tradicional y reconocidas como fuentes de compuestos bioactivos con potencial antiinflamatorio; sin embargo, la especie *Combretum rupicola* aún carece de estudios detallados. Este trabajo tuvo como objetivo extraer constituyentes químicos de las hojas de *C. rupicola*, identificar cualitativamente la presencia de flavonoides y evaluar, mediante simulaciones *in silico*, la interacción de compuestos característicos de la familia con dianas moleculares inflamatorias. Las hojas fueron recolectadas en el IFTO–Campus Araguatins, procesadas y sometidas a extracción por ultrasonido con una solución de acetonitrilo/metanol (80:20), seguida de liofilización. Los ensayos fitoquímicos confirmaron la presencia de flavonoides, destacándose la quercitrina. Para el estudio *in silico*, se seleccionaron ligandos descritos en Combretaceae, incluyendo quercitrina, kaempferol, ácido betulínico, combretol, rhamnazina y combretastatina A-4. Las proteínas COX-2, NLRP3, P38, TNF y CXCR4 se utilizaron como blancos moleculares, y los experimentos de acoplamiento molecular se realizaron con AutoDock 4.2. Los resultados mostraron interacciones favorables entre los ligandos y los sitios activos de las proteínas, con énfasis en la quercitrina y la combretastatina, que presentaron energías de unión comparables o superiores a las de los inhibidores de referencia. Estos hallazgos sugieren que *C. rupicola* es una fuente prometedora de compuestos con potencial antiinflamatorio, lo que justifica futuras investigaciones experimentales.

PALABRAS CLAVE: *Combretum rupicola*; flavonoides; acoplamiento molecular; inflamación; inhibidores naturales.

INTRODUÇÃO

O gênero *Combretum* (Combretaceae) é amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais, sendo utilizado tradicionalmente na medicina popular para o tratamento de inflamações, infecções e outras condições crônicas. A relevância desse grupo de plantas está associada à sua riqueza em metabólitos secundários, especialmente flavonoides e triterpenos, cuja atividade biológica já foi demonstrada em diferentes contextos (Fyhrquist et al., 2002; Martins et al., 2020).

Entre esses compostos, destacam-se a quercitrina, kaempferol, combretol, rhamnazin, combretastatina e o ácido betulínico, já descritos em espécies do gênero e reconhecidos por atividades anti-inflamatórias e moduladoras de vias intracelulares. A literatura mostra que flavonoides possuem capacidade de interagir com alvos como COX-2, P38 e TNF- α , interferindo em cascatas pró-inflamatórias (Calderón-Montaña et al., 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar o potencial de ligantes oriundos de *Combretum rupicola* por meio de abordagens *in silico*, com foco em proteínas envolvidas em processos inflamatórios chave: COX-2, NLRP3, P38, TNF e CXCR4. A escolha desses alvos justifica-se pelo seu papel central em doenças inflamatórias e crônicas. A integração entre dados

etnofarmacológicos e modelagem molecular auxilia na compreensão do potencial farmacológico da espécie e orienta futuras validações experimentais.

2 Metodologia

2.1 Extração vegetal

As folhas de *Combretum rupicola* foram coletadas na reserva legal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins – IFTO, Campus de Araguatins, localizada ao oeste do estado do Tocantins (coordenadas geográficas: -5°38'42.5"S, 48°04'12.8"W). Durante a coleta, foi confeccionada exsicata em campo, e o material foi devidamente armazenado, com depósito da exsicata no Herbário do IFTO sob o registro nº 335. As amostras coletadas foram armazenadas em freezer a -18 °C no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) até o processamento.

2.2 Processamento do material

As folhas foram selecionadas manualmente, lavadas em água corrente e enxaguadas com água destilada. Em seguida, foram distribuídas em seis embalagens de papel craft, contendo 200 g cada, devidamente identificadas. As embalagens foram perfuradas para facilitar a circulação de ar e acondicionadas em estufa de circulação forçada (SL-102, Ethik), mantida a 50 °C, até atingirem peso constante (aproximadamente 48 horas). Após secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas Willye (modelo datar FT-50) utilizando peneira de 0,3 mm, e o pó resultante foi armazenado em recipientes de vidro mantidos em dessecador.

2.3 Obtenção do extrato

O pó obtido (20 g) foi submetido à extração em solução de acetonitrila e metanol (80:20 v/v), em béquer de 100 mL. A mistura foi submetida à ultrassonificação por 60 minutos, sendo posteriormente filtrada. O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador sob rotação de 70 rpm e temperatura de 55 °C. O resíduo obtido foi liofilizado, originando o extrato bruto de *C. rupicola*, utilizado para os testes subsequentes.

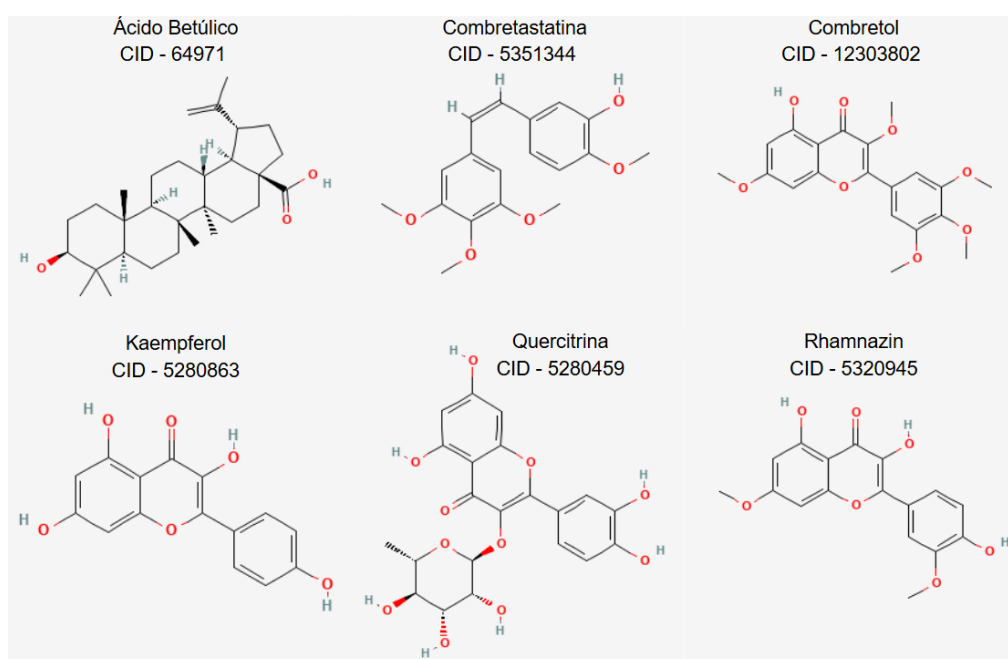
2.4 Perfil Fitoquímico

Foram realizados ensaios qualitativos visando a identificação de flavonoides no extrato, de acordo com metodologia adaptada de Costa (2001). Os testes envolveram a extração alcoólica seguida de aquecimento e posterior filtração, com observação de reações características que confirmaram a presença de flavonoides. A quercitrina foi identificada como constituinte representativo, em conformidade com relatos prévios da família Combretaceae.

2.5 Preparação dos ligantes

Os ligantes selecionados (figura 1) para este estudo foram: kaempferol (CID 5280863), quercitrina (CID 5280459), ácido betulínico (CID 64971), combretol (CID 12303802), rhamnazin (CID 5320945) e combretastatina (CA-4) (CID 5351344). Ainda, cada ligante teve seus tautômeros mais estáveis em pH fisiológico (7,4) e temperatura de 310 K gerados pelo *MarvinSketch* (ChemAxon, Budapest, Hungary). Posteriormente, a geometria foi otimizada no Avogadro (Hanwell et al., 2012) com campo de força padrão. Em seguida, os compostos foram preparados no AutoDock Tools (Morris et al., 2009), onde receberam cargas Gasteiger e foram atribuídas as torções rotacionais possíveis.

Figura 1: Representação em 2D dos ligantes utilizados nas análises *in silico*.



Fonte: Autores, 2025.

2.6 Preparação das proteínas

As proteínas-alvo foram selecionadas a partir do Protein Data Bank (RCSB PDB, 2025), cada uma com seu respectivo inibidor de referência:

- COX-2 (PDB: 3LN1, inibidor: celecoxibe, CID: 2662);
- NLRP3 (PDB: 7PZC, inibidor: CRID3, CID: 91826093):
 - apenas a cadeia A utilizada, devido ao caráter de decâmero;
- P38 (PDB: 1A9U, inibidor: SB203580, CID: 176155);
- TNF (PDB: 2AZ5, inibidor: SPD304, CID: 5327044);
- CXCR4 (PDB: 8ZPN, inibidor: AMD3100, CID: 65015);

As proteínas foram abertas inicialmente no ChimeraX (Pettersen et al., 2021) para inspeção estrutural e exclusão de moléculas não essenciais (ex.: água não estrutural). Posteriormente, foram processadas no ADT, recebendo cargas Kollman, reparos em resíduos de aminoácidos e ajustes de nomes compatíveis.

Para proteínas que possuem grupamentos heme com ferro em estado Fe^{2+} , como na COX-2, utilizou-se o AmberTools (Case et al., 2021) para geração de cargas parciais adequadas. Isso se justifica porque cofatores metálicos não apresentam parâmetros padrão nos softwares de docking, exigindo ajustes específicos para representar corretamente suas interações eletrônicas.

2.7 Definição dos grids

A preparação dos grids foi centrada sobre os inibidores de referência, garantindo que as docagens fossem focadas em sítios ativos conhecidos. As dimensões e parâmetros de cada grid foram:

- COX-2: spacing 0,169 Å; npts $126 \times 124 \times 124$; center (30.101, -22.559, -15.758);
- NLRP3: spacing 0,375 Å; npts $76 \times 76 \times 76$; center (192.728, 205.389, 119.764);
- P38: spacing 0,375 Å; npts $76 \times 76 \times 76$; center (3.708, 15.850, 28.973);
- TNF: spacing 0,236 Å; npts $76 \times 76 \times 76$; center (-19.163, 74.451, 33.837);
- CXCR4: spacing 0,375 Å; npts $76 \times 76 \times 76$; center (20.389, -8.747, 71.653);

2.8 Docagem molecular

As docagens foram conduzidas pelo AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009), utilizando o algoritmo genético (GA), esses parâmetros foram ajustados visando robustez estatística e redução de poses incongruentes. Os parâmetros definidos foram:

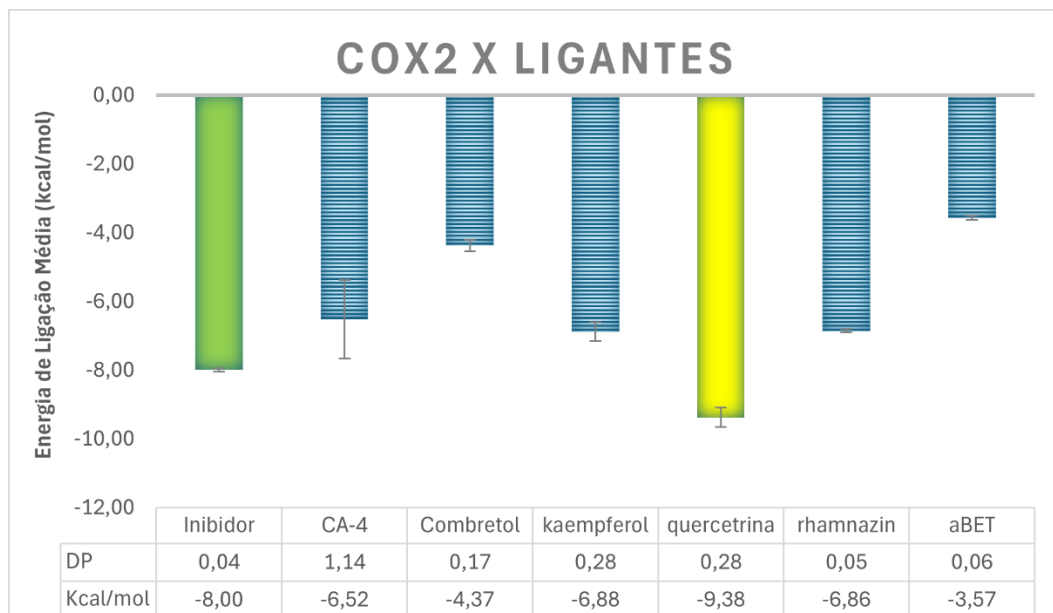
- Número de runs: 50 (ou 200 para casos de clusters muito dispersos);
- População: 300 indivíduos;
- Avaliações máximas: 25.000.000;
- Gerações máximas: 27.000;
- Taxa de mutação: 0,02;
- Taxa de crossover: 0,8;
- Crossover mode: twopt;
- Seed utilizada (reprodutibilidade): 18021802;

3 Resultados e discussão

3.1 Docking molecular

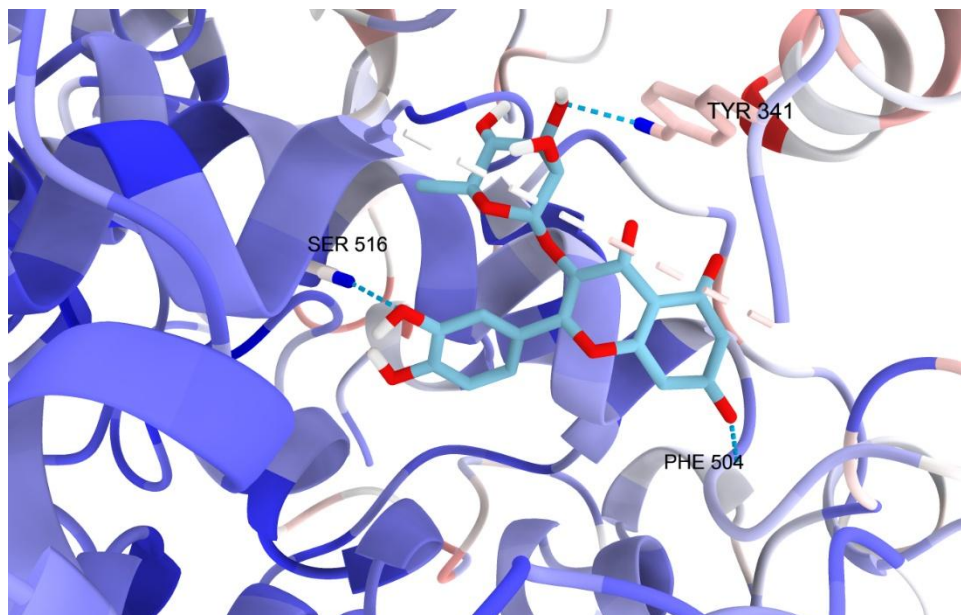
- Nos gráficos (Figuras 2A–6A), as energias de ligação correspondem às médias dos complexos do cluster mais estável, obtidas no Microsoft Excel 365; já nas Figuras 2B–6B estão representadas as conformações de menor energia, visualizadas no UCSF ChimeraX.
- COX-2 (Figura 2A): Quercitrina e combretastatina apresentaram energias de ligação mais negativas que o celecoxibe, sugerindo inibição competitiva no sítio ativo. Na conformação mais favorável (Figura 2B, $-9,56$ kcal/mol), o complexo COX-2/Quercitrina mostrou contatos relevantes com SER516, TYR341 e PHE504, reforçando a estabilidade do acoplamento.
- NLRP3 (Figura 3A): Quercitrina superou o inibidor CRID3, indicando potencial de modulação direta do inflamassoma. Na conformação de menor energia (Figura 3B, $-9,03$ kcal/mol), o complexo NLRP3/Quercitrina apresentou duas ligações de hidrogênio com ILE370 e uma com ALA227, evidenciando afinidade robusta com o sítio ativo.
- P38 (Figura 4A): Kaempferol e combretastatina exibiram afinidades equivalentes ou superiores ao inibidor SB203580. Na conformação mais estável (Figura 4B, $-11,23$ kcal/mol), o complexo P38/Combretastatina (CA4) estabeleceu interação direta com LYS53, resíduo essencial para a atividade catalítica da quinase.
- TNF (Figura 5A): Quercitrina e combretol apresentaram valores próximos ao inibidor SPD304. Na conformação de menor energia (Figura 5B, $-9,59$ kcal/mol), o complexo TNF/Quercitrina formou interações com TYR151 (duas ligações de hidrogênio) e GLY121, sugerindo estabilidade significativa do acoplamento.
- CXCR4 (Figura 6A): Quercitrina e combretastatina apresentaram energias comparáveis a AMD3100, reforçando o potencial de atuação sobre receptores de quimiocinas. Na conformação mais favorável (Figura 6B, $-9,97$ kcal/mol), o complexo CXCR4/Combretastatina (CA4) interagiu com GLN200 e TYR255, resíduos localizados na região de reconhecimento do receptor.

Figura 2A - Resultados da COX-2.



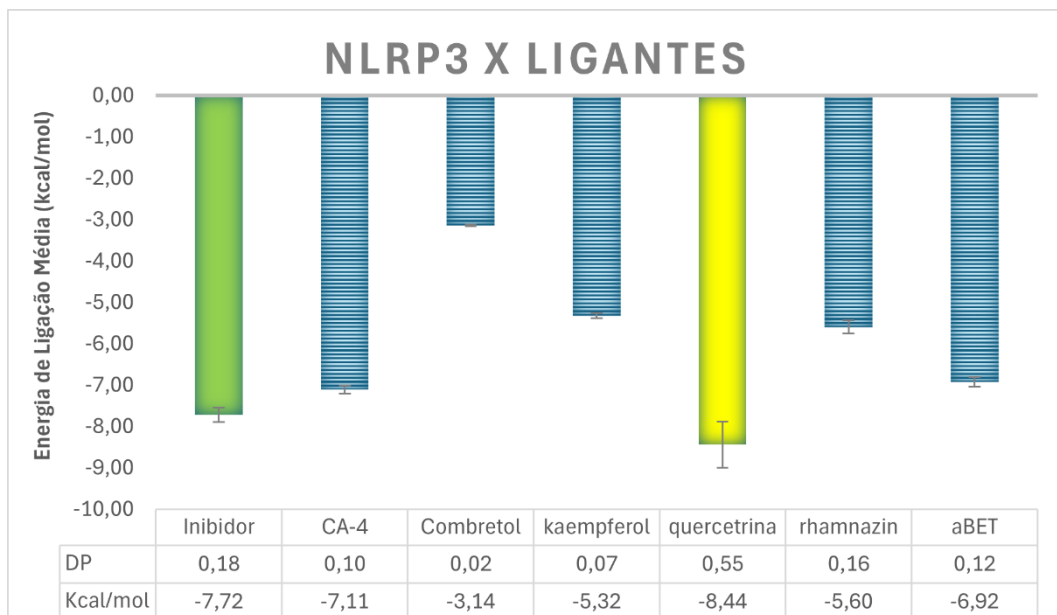
Fonte: Autores, 2025.

Figura 2B - Pose de maior ligação entre COX2 e quercitrina.



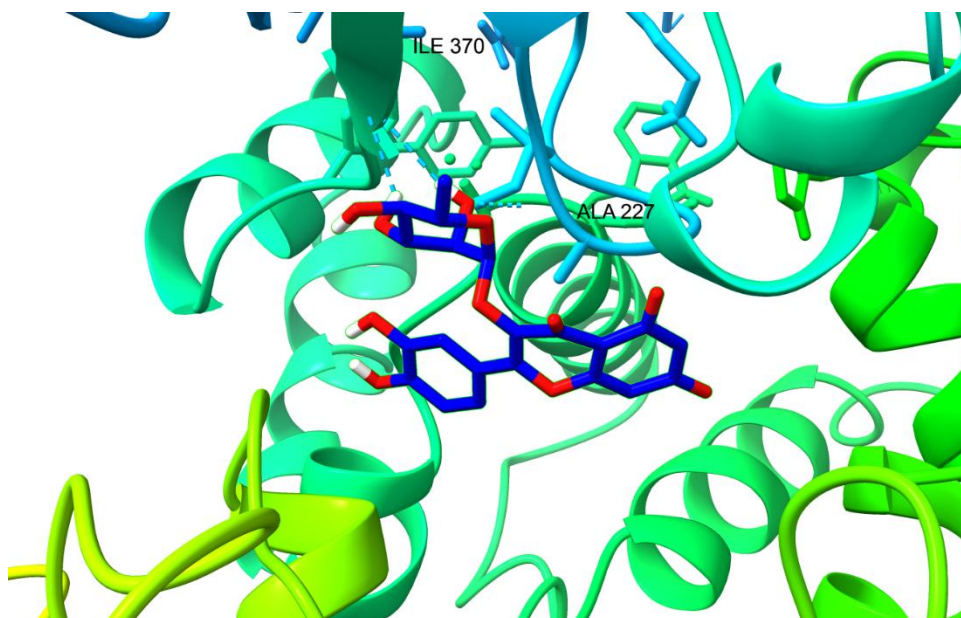
Fonte: Autores, 2025.

Figura 3A - Resultados da NLRP3.



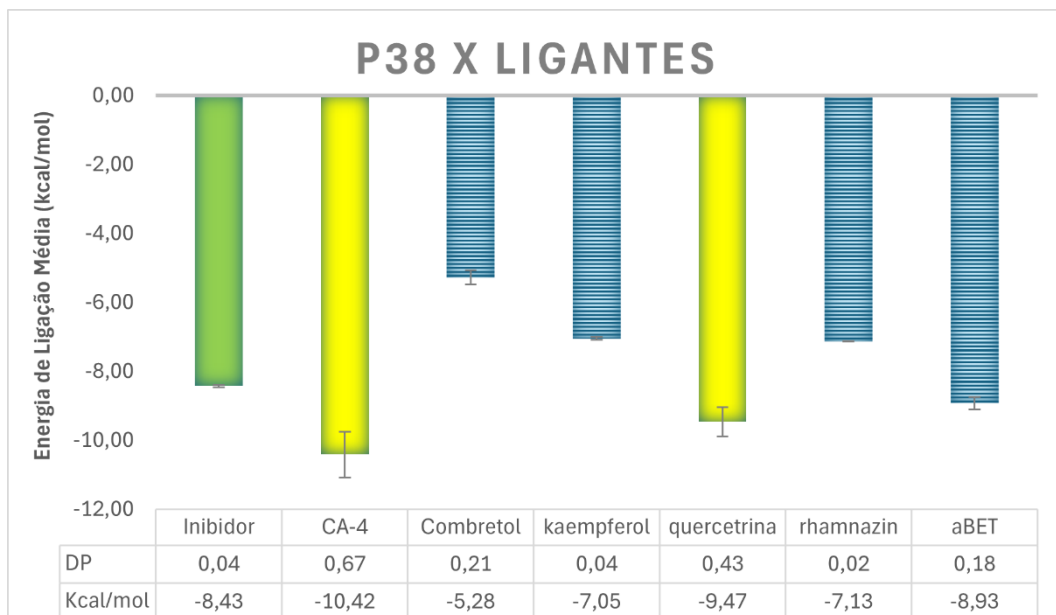
Fonte: Autores, 2025

Figura 3B - Pose de maior ligação entre NLRP3 e quercitrina.



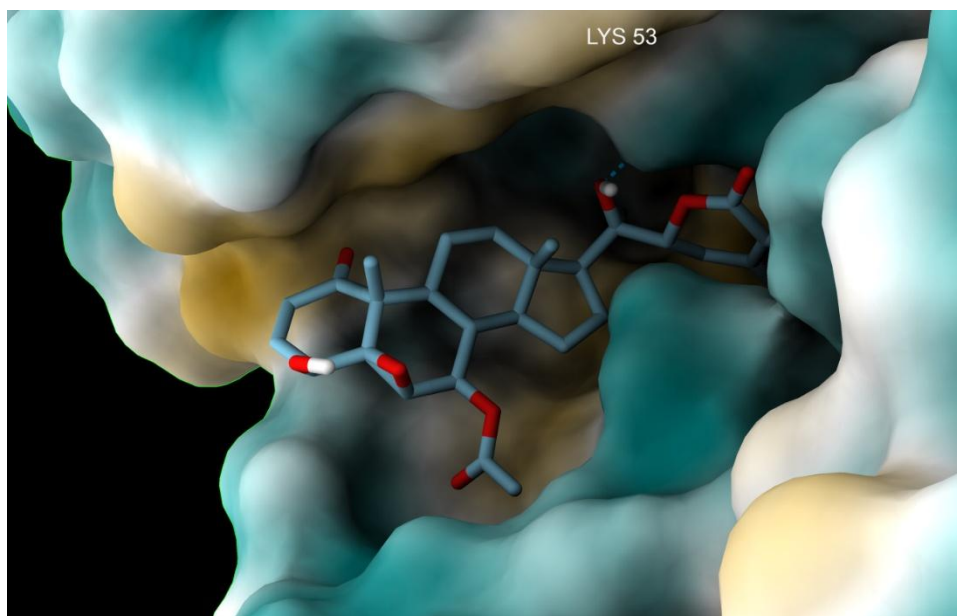
Fonte: Autores, 2025

Figura 4A - Resultados da P38.



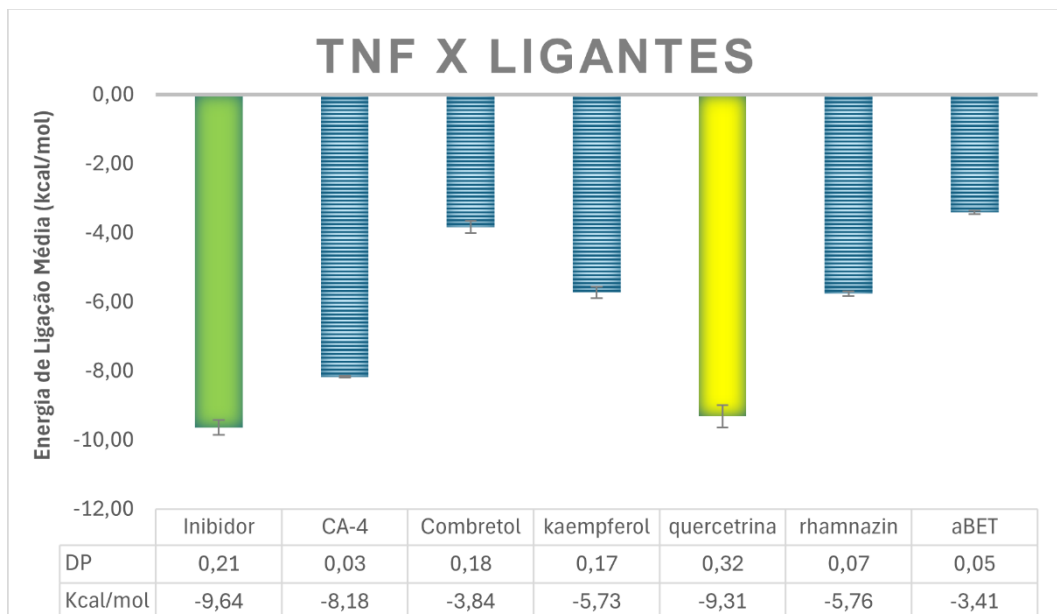
Fonte: Autores, 2025.

Figura 4B - Pose de maior ligação entre P38 e CA-4.



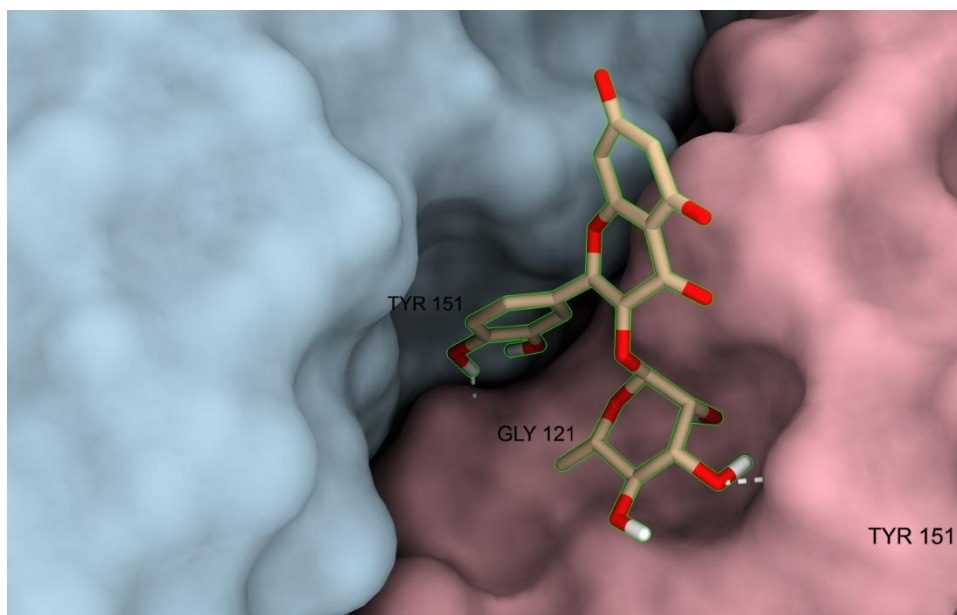
Fonte: Autores, 2025.

Figura 5A - Resultados da TNF.



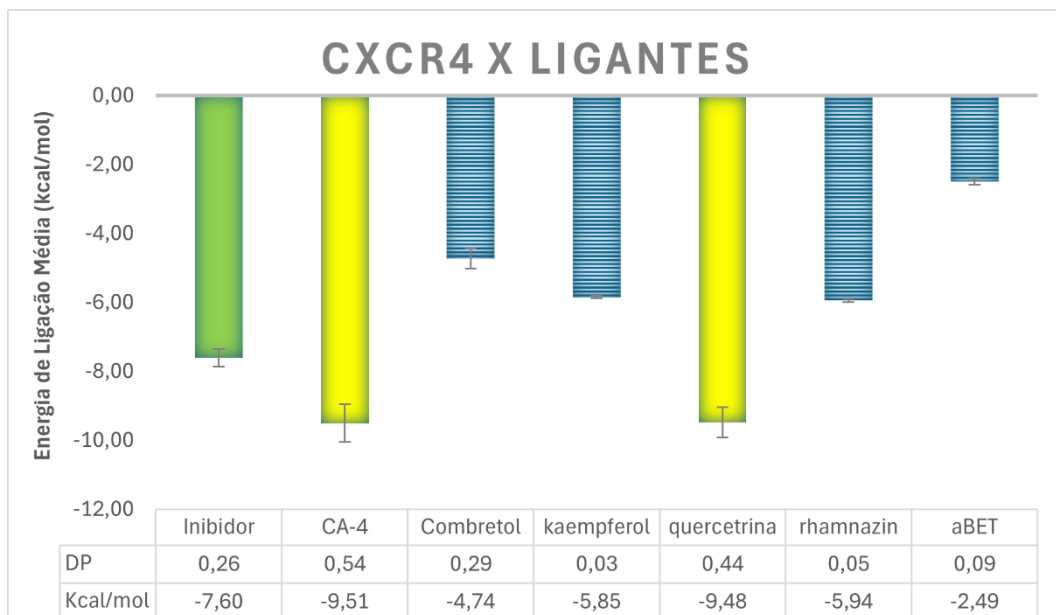
Fonte: Autores, 2025

Figura 5B - Pose de maior ligação entre TNF e quercitrina.



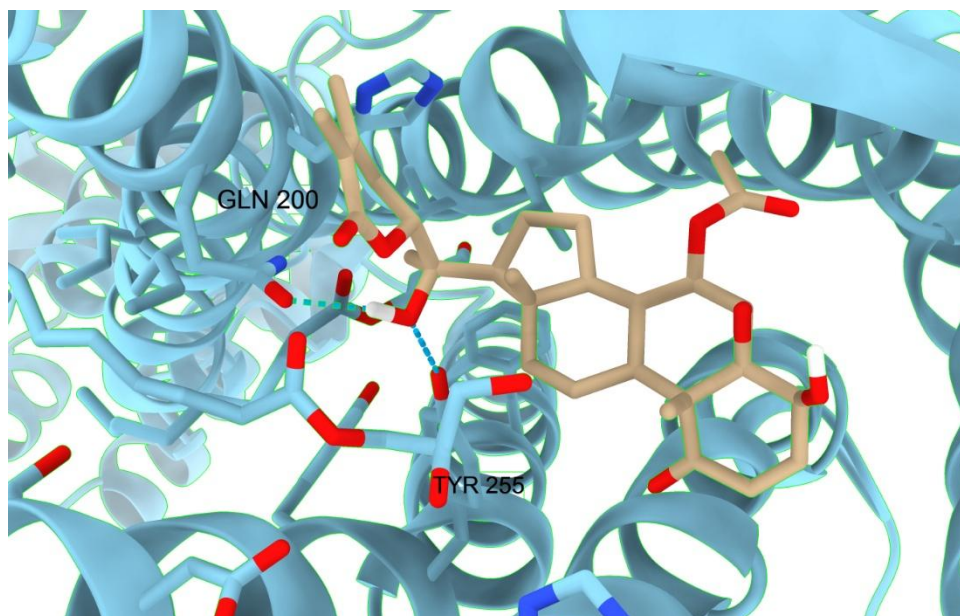
Fonte: Autores, 2025

Figura 6A - Resultados da CXCR4.



Fonte: Autores, 2025.

Figura 6B - Pose de maior ligação entre CXCR4 e CA-4.



Fonte: Autores, 2025.

Os resultados de docking evidenciam o potencial farmacológico de compostos de *C. rupicola*. A quercitrina foi o ligante de melhor desempenho, pois apresentou valores mais negativos de energia de ligação que os inibidores de referência, superando os inibidores de referência em COX-2, NLRP3 e CXCR4, sugerindo potencial competitivo, o que reforça seu papel como biomarcador químico da espécie. Esses achados estão alinhados com evidências de que flavonoides podem atuar na modulação da resposta inflamatória por múltiplos mecanismos, incluindo inibição da COX-2 e regulação da ativação de inflamassomas (Hodek et al., 2002; Calderón-Montaña et al., 2011).

A combretastatina, conhecida por sua ação antitumoral, apresentou alta afinidade em COX-2 e P38, proteínas chave na produção de mediadores inflamatórios. Sua presença no gênero *Combretum* sugere um efeito multifuncional, com potencial de modular tanto vias inflamatórias quanto neoplásicas (Pettit et al., 1982).

Kaempferol reforçou sua ação sobre MAPKs, já descrita em literatura, ao apresentar alta afinidade por P38. Esse resultado confirma sua relevância como flavonoide amplamente estudado em contextos anti-inflamatórios (Calderón-Montaña et al., 2011).

De forma geral, os resultados *in silico* corroboram relatos etnofarmacológicos do uso de *Combretum* em processos inflamatórios, e indicam que os flavonoides presentes na espécie podem atuar de maneira sinérgica sobre diferentes alvos moleculares, ampliando seu potencial terapêutico.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu confirmar a presença de flavonoides em *Combretum rupicola*, incluindo a quercitrina, e demonstrou, por meio de docking molecular, o potencial de interação desses compostos com diferentes alvos inflamatórios (COX-2, NLRP3, P38, TNF e CXCR4). Os resultados indicam que a espécie pode constituir uma fonte promissora de moléculas com ação anti-inflamatória, justificando a continuidade das investigações com abordagens *in vitro* e *in vivo*.

Agradecimentos

À equipe de estudantes. Ao apoio financeiro recebido do FINEP, CAPES, PROEXT/UFT. PROPESQ/UFT, FAPTO, FAPT.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. M. M. Overview of sample preparation and chromatographic methods to analysis pharmaceutical active compounds in waters matrices. *Separations*, v. 8, p. 16, 2021.

- BENSON, H. A. E. Transdermal drug delivery: penetration enhancement techniques. *Current Drug Delivery*, v. 2, n. 1, p. 23–32, 2005.
- BARRY, B. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, n. 2, p. 101–114, 2001.
- BORGES, J. C. M. et al. Mosquitocidal and repellent potential of formulations containing wood residue extracts of a Neotropical plant, *Tabebuia heptaphylla*. *Industrial Crops and Products*, v. 129, p. 424–433, 2019.
- BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 115, p. 453–472, 1962.
- CALDERÓN-MONTAÑO, J. M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 4, p. 298–344, 2011.
- CASE, D. A. et al. *AMBER 2021*. San Francisco: University of California, 2021.
- CHEMAXON. *MarvinSketch*, version XX. Budapest: ChemAxon, 2023. Disponível em: <<https://chemaxon.com/products/marvin>>.
- CHEN, L. et al. Widespread occurrence of in-source fragmentation in the analysis of natural compounds by LC-ESI-MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 37, e9519, 2023.
- COSTA, A. F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3. ed., v. 3, 2001.
- COZZOLINO, S. M. F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. 3. ed. São Paulo: Manole, 2009.
- DAWE, A.; PIERRE, S.; TSALA, D. E.; HABTEMARIAM, S. Phytochemicals of constituents *Combretum* Loefl. (Combretaceae). *Pharmaceutical Crops*, v. 4, p. 38–59, 2013.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacological Research*, v. 112, p. 4–29, 2016.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 308–323, 2007.
- ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R.; MCGAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 119, p. 686–699, 2008.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, v. 4, p. 17, 2012.
- HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids—potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.
- HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, v. 3, n. 1, p. 107–124, 2011.

MARTINS, N.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. In vivo activity of phenolic compounds: facts and gaps. *Trends in Food Science & Technology*, v. 99, p. 79–90, 2020.

MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. *Molecules*, v. 15, p. 8534–8542, 2010.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de qualidade de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 2003.

NUNES, C. R. et al. Plants as sources of anti-inflammatory agents. *Molecules*, v. 25, n. 16, p. 3726, 2020.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of combretastatin A-4. *Experientia*, v. 38, n. 10, p. 1168–1169, 1982.

RCSB PDB. Protein Data Bank [Internet]. 2025. Disponível em: <<https://www.rcsb.org>>. Acesso em: 13 set. 2025.

SHAYGANNI, E. et al. Inflammaging and cardiovascular disease: management by medicinal plants. *Phytomedicine*, v. 23, n. 11, p. 1119–1126, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Spectrometric identification of organic compounds. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2005.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. Statistical methods. 6. ed. Ames: Iowa State, 1974.

SOARES, I. M. et al. Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 19, n. 2, p. 106–121, 2006.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking. *Journal of Computational Chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TUNGMUNNITHUM, D. et al. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines*, v. 5, p. 93, 2018.

WEI, H. et al. Serum klotho: a potential predictor of cerebrovascular disease in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*, v. 20, p. 63, 2019.

ZIGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *Journal of Experimental Medicine*, v. 137, p. 387–410, 1973.