

LORENA BAVIA

**CONTRIBUIÇÃO DO COMPONENTE C5
DO SISTEMA COMPLEMENTO
EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE
DOENÇA HEPÁTICA ALCOÓLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Lourdes Isaac

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

BAVIA, L. **Contribuição do componente C5 do sistema complemento em modelo experimental de doença hepática alcoólica.** 2013. 248 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A imunidade inata contribui efetivamente para o desenvolvimento da Doença Hepática Alcoólica (DHA). Dentre os componentes da imunidade inata, em um contexto inflamatório, a ativação do sistema complemento pode ser um importante fator ligado à patogenia desta doença. Modelos murinos de DHA mostraram evidências da contribuição de C3 para o acúmulo de triglicerídeos no fígado e também no tecido adiposo. Já a proteína C5 parece estar envolvida com a injúria e inflamação hepática após o consumo crônico de etanol. Portanto, tivemos como objetivos: a) investigar a contribuição do componente C5 no estabelecimento e manutenção da DHA aplicando as linhagens C57Bl/6 (B6) e A/J, e a congênica B6 C5 deficiente (B6.A-Hc⁰); e, b) desenvolver duas linhagens congênicas para introduzir o gene *c5* mutante da linhagem A/J em fundo genético B6, e vice-versa. Para isso, camundongos B6 e A/J machos com 10 semanas de idade foram tratados com a dieta hiperlipídica de Liber-DeCarli modificada contendo etanol, ou maltodextrina, ou apenas a dieta, por 6, 8 e 10 semanas. Ao final de cada semana determinamos o número de leucócitos circulantes, coletamos material para análise histopatológica, determinamos a quantidade de triglicerídeos hepáticos, e quantificamos citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-10) hepáticas por ELISA. Observamos que em ambas as linhagens que receberam etanol houve hepatomegalia acompanhada de acúmulo de triglicerídeos, e redução das citocinas IL-6 e IL-12 ao longo das semanas de tratamento. A linhagem A/J tratada com etanol apresentou aumento de leucócitos circulantes, de IL-10 e de NO hepáticos. Além disso, apresentou menor acúmulo de triglicerídeos hepáticos em relação à linhagem B6. A linhagem B6 tratada com etanol apresentou aumento de IL-1 β e redução de IL-10 hepáticos. Dessa forma, a linhagem A/J sofreu mais danos inflamatórios que a B6, mas esteve mais protegida do acúmulo de triglicerídeos hepáticos. Uma vez validados por sequenciamento de nucleotídeos, ensaio hemolítico da Via Alternativa, imunodifusão dupla e por microssatélite, os camundongos B6.A-Hc⁰ e B6 foram tratados com as mesmas dietas anteriores por 10 semanas. Incluímos nas análises a concentração sérica de aspartato aminotransferases, fosfatase alcalina, albumina, glicose, triglicerídeos e colesterol. Coletamos materiais para análise histopatológica e ainda determinamos as quantidades de triglicerídeos e colesterol hepáticos. Por fim, quantificamos a concentração das citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TGF- β) e a produção de NO no tecido hepático. Observamos que o tratamento com etanol aumentou a concentração de IL-17 e IL-10 e reduziu IL-1 β e TGF- β hepáticas nos camundongos B6.A-Hc⁰ em relação aos B6. Encontramos também diferenças entre as linhagens, mas independente da dieta, onde os animais B6.A-Hc⁰ apresentaram maior concentração de todos os parâmetros séricos avaliados, exceto glicose. E ainda observamos na linhagem B6.A-Hc⁰ menor concentração hepática de IL-6, IL-12 e IFN- γ . Concluímos que o C5 favoreceu um ambiente hepático pró-inflamatório ao mesmo tempo que parece ser importante para o controle sérico das enzimas de função e síntese hepática, assim como do perfil lipídico no modelo de DHA.

Palavras-chave: Sistema complemento. Componente C5. Doença Hepática Alcoólica. Inflamação. Citocinas. Camundongos congênicos C5 deficientes e C5 suficientes.

ABSTRACT

BAVIA, L. **Contribution of murine complement component C5 in experimental alcoholic fatty liver disease.** 2013. 248 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Innate immunity contributes effectively to the development of Alcoholic Liver Disease (ALD). The complement system activation may play an important role in the pathogenesis of this disease. Murine models of ALD have showed evidences of the C3 contribution to the accumulation of triglycerides in liver and in adipose tissue. On the other hand, C5 protein seems to be involved with inflammation and liver injury after chronic ethanol consumption. In this work we investigated the contribution of the C5 component in the establishment and maintenance of ALD employing C57Bl/6 (B6) and A/J, and B6 C5 deficient congenic mice (B6.A-*Hc*⁰). We also developed two congenic strains introducing the mutant gene *c5* of A/J in genetic background of B6 mice, and the other way around. Ten-week old B6 and A/J male mice were treated with modified Liber-DeCarli diet, containing or not, ethanol or maltodextrin. To determine the time of treatment which most highlights the differences among the strains, mice were treated daily for 6, 8 and 10 weeks. After this period, tissue samples were collected for histopathological analysis and we quantified the number of circulating leukocytes, the amount of hepatic triglycerides and the liver cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, IL-10). We observed that in both strains treated with ethanol there was hepatomegaly, accumulation of triglycerides in the liver, and a reduction of IL-6 and IL-12. The A/J mice group had increased numbers of circulating leukocytes, and increased levels of IL-10 and NO in the liver. They also showed a reduction in liver triglycerides compared to B6 mice, which had increased IL-1 β and reduced IL-10. Therefore, A/J strain presented more inflammatory liver damage than B6, but was more protected from hepatic triglyceride accumulation. The next step of this work was to study the congenic B6.A-*Hc*⁰ and B6 mice. Before starting the diet administration, these animals were validated by nucleotide sequencing, alternative pathway hemolytic assay, immunodiffusion and microsatellite. Then, the congenic B6.A-*Hc*⁰ and B6 mice were treated with the same diets above described for 10 weeks. The following parameters were analyzed: serum aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, albumin, glucose, triglycerides and cholesterol. We also collected tissue samples for histopathological analysis, determined the amounts of liver triglycerides, and quantified the concentration of liver cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TGF- β) and NO production. We observed that treatment with ethanol increased the concentration of IL-17 and IL-10 and reduced IL-1 β and TGF- β in the liver of B6.A-*Hc*⁰ mice compared to B6. We also found differences between the strains regardless the diet. B6.A-*Hc*⁰ mice presented higher concentrations of all serum parameters evaluated, with the exception of glucose. These animals also had a lower concentration of IL-6, IL-12 and IFN- γ in the liver. We conclude that the C5 component contributes to liver inflammation. The presence of this molecule seems to be important for the control of liver homeostasis and serum lipid profile in the model of DHA.

Keywords: Complement system. Complement component C5. Alcoholic Fatty Liver Disease. Inflammation. Cytokines. Congenic mice C5 deficient and C5 sufficient.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema complemento

O sistema complemento é formado por 30 ou mais proteínas plasmáticas e de membrana. É um dos protagonistas centrais da imunidade inata, desempenhando importante papel na defesa contra a invasão de patógenos. Uma das relevantes funções do complemento é a opsonização de partículas ou microorganismos facilitando sua fagocitose e remoção. Ele também pode participar ativamente da resposta inflamatória por meio da produção de fatores quimiotáticos (C3a, C4a, C5a) que atraem células inflamatórias para o sítio de ativação (RICKLIN et al., 2010). O complemento pode ainda solubilizar e remover imunocomplexos evitando deposição e injúria tecidual (MILLER; NUSSENZWEIG, 1974), assim como ativar linfócitos B, estimulando-os para a síntese de imunoglobulinas (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001), além da lise de microorganismos pela formação do complexo de ataque à membrana (KONDOS et al., 2010).

1.1.1 Vias de ativação

1.1.1.1 Via Clássica

O início desta via depende principalmente da presença de imunocomplexos formados por anticorpos ligados especificamente a antígenos. O complexo protéico C1 é formado por uma molécula de C1q e duas moléculas de C1r e de C1s (C1qC1r₂C1s₂). C1q inicia a ativação da via clássica ao ligar-se ao imunocomplexo, quando sofre uma mudança conformacional e passa a ativar C1r. Após este ser ativado, ele exibe atividade de serino-protease e ativa C1s que, por sua vez, também passa e exibir um sítio catalítico de serino-protease podendo clivar C4 e C2. C4 cliva-se em C4a e C4b, e a este último liga-se C2 que então sofre ação enzimática de C1s ativado, formando C2a e C2b. Os fragmentos C4b2a formam a C3 convertase, responsável esta pela clivagem de C3 em C3a e C3b. Quando fragmentos C3b ligam-se ao complexo C4b2a [C4b2a3b_n], forma-se então a C5 convertase (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (**Figura 1**). A ação desta enzima será abordada na página seguinte.

1.1.1.2 Via Alternativa

A ativação desta via inicia-se a partir da hidrólise espontânea da ligação tiól-éster localizada na cadeia α do componente C3 gerando C3(H₂O). Esta molécula exibe sítio reativo para a proteína plasmática fator B (fB), formando o complexo C3(H₂O)B. Nesta condição, o fB pode ser clivado, pela enzima fator D (fD), em Ba e Bb. O fragmento Bb permanece ligado ao C3(H₂O)Bb, formando a primeira C3 convertase desta via, que agora apresenta atividade de serino-protease e cliva C3 em C3a e C3b. C3b, assim como C3(H₂O), apresenta sítio para a ligação do fB, o qual, uma vez ligado a C3b, sofrerá clivagem pelo fD, resultando no complexo C3bBb, a segunda C3 convertase desta via. Quando C3 se liga ao complexo C3bBb forma C3bBb3b_n, o qual exerce atividade de C5 convertase (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (**Figura 1**).

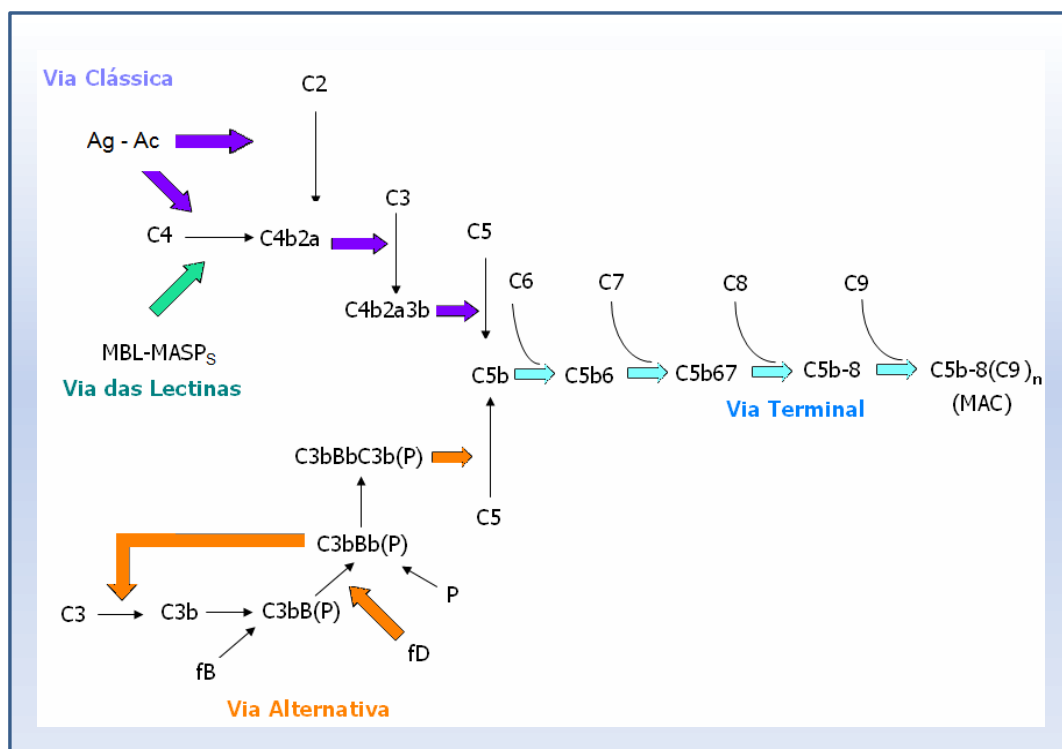
1.1.1.3 Via das Lectinas

Esta via inicia-se a partir da ligação de açúcares como manose a lectinas, como a lectina ligadora de manose (*mannose binding lectin* - MBL). A MBL tem estrutura semelhante a C1q, mas se liga a resíduos de manose, N-acetil-glicosamina, frutose, glicose, entre outros resíduos abundantes na superfície de microorganismos (TURNER, 2003). À MBL estão associadas três serino-proteases, *mannose-binding lectin-associated serine protease-1* (MASP-1), MASP-2, MASP-3, que são ativadas quando a MBL se liga a açúcares. Essa ativação leva à clivagem de C4 e de C2, resultando na formação de C3 convertases e C5 convertases, semelhantes às convertases geradas na via clássica (RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001) (**Figura 1**).

1.1.2 Via terminal comum

As C5 convertases formadas tanto pelas vias clássica/das lectinas (C4b2a3b) como pela via alternativa (C3bBb3b) clivam o componente C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b adere à superfície celular e a ele o componente C6 se liga, formando o complexo C5b6. A este complexo incorpora-se também o componente C7, C8 e até 18 moléculas de C9, formando o complexo de ataque à membrana (MAC) C5b678(9)_n. O MAC se insere na célula como um canal transmembrânico, favorecendo o desequilíbrio iônico e aumento do volume intracelular levando ao rompimento da membrana celular (lise) (KONDOS et al., 2010) (**Figura 1**).

Figura 1 - Ativação geral do sistema complemento.



Ativação do Sistema de Complemento. As três vias culminam na Via terminal comum com a formação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC), causando a lise da célula.
 Fonte: Adaptado de Morgan e Harris (1999).

1.2 O componente C5

O componente C5 pertencente à via terminal comum será o alvo de estudo em nosso trabalho. Sua biossíntese é realizada principalmente nos hepatócitos (MORGAN; GASQUE, 1997). No entanto, sítios secundários também sintetizam C5 como: pulmão, baço, intestino fetal, monócitos, macrófagos e células alveolares tipo II (WETSEL, 2000).

C5 é uma glicoproteína com 190 kDa que consiste de 2 cadeias polipeptídicas, cadeia α e cadeia β , com massa molecular de 155 e 75 kDa, respectivamente, as quais são ligadas entre si por ponte dissulfídica (TACK; MORRIS; PRAHL, 1979). É sintetizada inicialmente como uma única cadeia precursora, Pró-C5, de 1676 aminoácidos (aa) incluindo um peptídeo líder com 18 aa e uma sequência de ligação rica em arginina. O precursor de C5 (Pró-C5) é processado intracelularmente, originando as duas cadeias α e β , que se mantêm juntas por ligação dissulfídica e forças não-covalentes (WETSEL, 2000). Carney e colaboradores (1991)

determinaram que o gene *c5* contém 41 éxons os quais abrangem uma região genômica de 79 kb.

Por meio de estudo com células somáticas hibridadas com DNA complementar (cDNA) e por hibridação *in situ*, Jeremiah e colaboradores (1987,1988) localizaram o gene *c5* humano no cromossomo 9q22-q34. No mesmo período, Wetsel e seu grupo (1987) também contribuíram para a análise molecular do gene *c5* humano na banda cromossômica 9q32-q34, com maior concentração na região 9q34.1 . D'Eustachio et al. (1986) estudando a localização cromossômica de genes que codificam os componentes do complemento C5 e fator H em camundongos, ratos e hamster chinês, encontraram que o gene estrutural *c5* murino localiza-se no cromossomo 2. Wetsel, Fleischer, Haviland (1990) observaram que a deleção de dois pares de base (pb), uma timina e uma adenosina (TA), no éxon 7 próximo a extremidade 5' do gene *c5* (HAVILAND et al., 1991) era responsável pela deficiência de C5 em camundongos. A deleção de TA, afeta a sequência de leitura, gerando um códon de parada prematura (UGA) a quatro pares de base do local da deleção.

1.3 Os receptores de C5a

O fragmento C5a exerce a maioria de suas atividades biológicas através da ligação com seus receptores. O gene codificador para o receptor de C5a (C5aR) encontra-se no cromossomo 19q13.3 em humanos e no cromossomo 7 em camundongos e é encontrado em vários tipos celulares como eosinófilos, basófilos, neutrófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos. A sua interação com C5a pode mediar a inflamação local e sistêmica (HAWLISCH et al., 2005) e também regular a liberação de citocinas e quimiocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-8 (EMBER; JAGELS; HUGLI, 1998). O receptor C5aR pertence à família dos receptores acoplados à proteína G (KLOS et al., 2009), já o receptor semelhante ao receptor de C5a (C5L2), descoberto em 2000 pelo grupo de Ohno foi considerado um receptor órfão putativo e não indutor de sinalização. O receptor C5L2 liga C5a, entretanto liga-se com maior afinidade ao fragmento de C5a que sofreu remoção da última arginina pela ação de uma N-carboxipeptidase (C5adesArg) (MATTHEUS; MUELLER-ORTIZ; WETSEL, 2004). Até o momento seu papel exato na resposta imune ainda é objeto de estudo (BAMBERG, et al., 2010). Existem trabalhos que mostram a expressão do receptor C5L2 em tecido adiposo e a ligação dos fragmentos C3a e C3adesArg a este receptor estimula a captura de glicose e a síntese de triglicerídeos pelo tecido adiposo. (CIANFLONE; XIA; CHEN, 2003; KALANT et al., 2005). Por outro lado, outros ligantes de C5L2 como C5a, C5adesArg

e C4a não estimulam a síntese de lipídeos (GAO et al., 2005). Portanto, a real função deste receptor permanece ainda obscura.

1.4 As funções biológicas de C5

As funções biológicas de C5 dependem da atuação de C5a e C5b de receptores que interagem com o primeiro fragmento. Com a clivagem de C5 em C5a e C5b, o produto ativado do complemento, C5a, desempenha poderosas atividades biológicas que afetam a resposta inflamatória. O fragmento C5b é essencial para a formação do MAC, contribuindo para eliminação de células-alvo, como bactérias, fungos ou protozoários (KONDOS et al., 2010).

Assim como C3a, o fragmento C5a é uma anafilatoxina. C5a é um forte regulador da vasodilatação, aumentando a permeabilidade dos pequenos vasos e induzindo a contração da musculatura lisa. Em células como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, a ligação do fragmento C5a em seu respectivo receptor, C5aR, pode estimular a explosão respiratória. Já em células como mastócitos e basófilos, C5a estimula a liberação de histamina. O fragmento C5a ainda é considerado um poderoso quimioatraente, recrutando células como: macrófagos, neutrófilos, linfócitos B ativados, linfócitos T, basófilos e mastócitos para o sítio inflamatório. Todas estas funções podem tanto contribuir para as funções imunes protetoras, quanto causar danos aos tecidos (GUO; WARD, 2005; KLOS et al., 2009).

Em adição às propriedades pró-inflamatórias do fragmento C5a, descritas acima, estudos recentes mostram que este fragmento também desempenha importante papel em outros contextos. Em 2000, Karp et al. empregando técnicas de microarranjo, polimorfismo de nucleotídeos (SNP) e *Quantitative Trait Locus* (QTL) identificaram o gene codificador de C5 como *locus* de susceptibilidade para o desenvolvimento da asma alérgica experimental. Addis-Lieser, Kohl, Chiaramonte (2005) estudaram o papel de C5 no desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleomicina. Estes autores observaram que durante a fase aguda C5 teve um papel protetor e anti-inflamatório, entretanto, durante o estágio crônico C5 contribuiu para o desenvolvimento de fibrose pulmonar. Estes dados sugerem o envolvimento de C5 tanto na inflamação quanto no reparo tecidual em modelos de fibrose induzido por bleomicina. Em modelos de fibrose hepática Hillebrandt et al. (2005) também empregaram a análise de QTL para identificar o *locus* que confere susceptibilidade à fibrose. O mesmo grupo também observou que C5 possui efeito fibrogênico tanto em modelos de fibrose murinos ou humanos. Complementando estes estudos sobre o papel fibrogênico do

componente C5 em modelo de fibrose biliar induzido pela técnica de ligação do ducto biliar aplicando camundongos C5 suficientes e C5 deficientes observou-se que nos camundongos C5 deficientes a inflamação tornou-se atenuada concomitante a redução significativa de fibrose biliar (SCHMITT et al., 2012). Estes estudos evidenciam o componente C5 como um potencial alvo para intervenções terapêuticas para o controle do desenvolvimento de fibrose.

Em modelo de malária cerebral os camundongos C57Bl/6 (C5 suficientes) são susceptíveis à infecção, já os camundongos A/J (C5 deficientes) são resistentes. Para investigar se esta susceptibilidade estaria associada ao componente C5 ou ao fundo genético, Patel et al. (2008) geraram camundongos congênicos C57Bl/6 (C5 deficientes) e A/J (C5 suficientes) e submeteram estes animais à infecção com *Plasmodium berghei*. Interessantemente, estes autores encontraram que os animais A/J C5 suficientes tornaram-se susceptíveis ao desenvolvimento da malária cerebral. Estes resultados implicam que C5 contribuiu para a patogênese da malária cerebral independentemente do fundo genético da linhagem de camundongo empregada no modelo. Da mesma forma, camundongos C5 ou C5aR deficientes também foram resistentes em desenvolver sepsis, quando submetidos ao modelo experimental de punção e ligação do ceco (WARD, 2008).

Outro exemplo da ação de C5, em especial de C5a, é a regulação da imunidade adaptativa em contexto tumoral. A geração de C5a no microambiente tumoral aumenta o crescimento do tumor, suprimindo linfócitos T CD8⁺. Esta supressão está associada com o recrutamento de células supressoras mielóides para o sítio tumoral. C5a estimula as células supressoras a produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais inibem a especificidade antigênica das células TCD8⁺, que por sua vez deixam de atuar sobre as células tumorais permitindo o seu desenvolvimento (MARKIEWSKI et al., 2008).

Em modelo de artrite auto-imune, a ativação do sistema complemento e a geração dos seus produtos de ativação, como C5a, podem iniciar a diferenciação de células Th17 a partir de células TCD4⁺. A expansão da subpopulação Th17 pode piorar o quadro de doenças auto-imunes ou a própria resposta imunológica às infecções. O bloqueio do C5aR pode beneficiar o controle da inflamação e da progressão de doenças auto-imunes mediadas por Th17 (HASHIMOTO et al., 2010).

Além das funções citadas acima, os componentes do complemento, em especial C5, estão associados com a promoção de doenças neurodegenerativas em modelos animais. Empregando o modelo murino de Doença de Alzheimer, Fonseca et al. (2009) estudaram a contribuição de C5a e C5aR na patogênese e comportamento neste modelo de doença neurodegenerativa. Sabendo que C5a recruta e ativa células da microglia e astrócitos via

C5aR, estes autores administraram aos camundongos um peptídeo antagonista do C5aR. Após este tratamento, houve redução no quadro patológico desencadeado pela progressão da doença, melhora comportamental e cognitiva dos camundongos. Estes resultados sugerem que a inibição da função mediada por C5aR pode interferir na neuroinflamação e neurodegeneração em modelos murinos de Doença de Alzheimer. Trabalhos empregando a administração de peptídeos antagonistas do C5aR em doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) foram elegantemente discutidos na revisão de Woodruff e colaboradores (2010). Esta revisão mostrou que o uso de antagonistas para C5aR protegeu os camundongos em vários modelos de doenças degenerativas, injúrias agudas do SNC e infecções do SNC. Além disso, foi identificado que tanto o componente C5 quanto o seu receptor foram expressos durante o período de neurulação com expressão localizada na região cefálica do tubo neural. Em modelo de deficiência de ácido fólico durante o processo gestacional a remoção do gene C5aR ou após a administração de peptídeo antagonista ao C5aR em camundongos fêmeas prenhes houve má formação do tubo neural (DENNY et al., 2013). Assim sendo, além da promoção de doenças relacionadas aos SNC o componente C5 e C5aR também estão envolvidos com o desenvolvimento embrionário neurológicos em mamíferos.

Portanto, reunimos aqui algumas funções que envolvem o componente C5, que vão desde o seu papel clássico como anafilatoxina e como um componente pró-fibrogênico, até como um fator chave para o desenvolvimento de respostas inflamatórias severas em condições de malária cerebral e sepsis, ainda contribui para a progressão tumoral e para as doenças que acometem o SNC.

1.5 O componente C5 e a regeneração hepática

O fígado, além de ser um órgão fundamental para síntese e armazenamento de glicose, ele também é responsável pela síntese de colesterol, assim como pela lipogênese e metabolismo de proteínas. É o principal órgão desintoxicador do corpo, por meio do metabolismo de diversos fármacos e toxinas, e conseqüentemente, pela remoção dos produtos resultantes deste processo. O fígado, mesmo desempenhando estas inúmeras funções, também possui extraordinária capacidade regenerativa, regulando sua própria massa e crescimento (TAUB, 2004).

O componente C5 pode exacerbar a resposta inflamatória e conduzi-la a danos severos como citamos anteriormente. Mas, curiosamente, ele também pode desempenhar um papel

claramente reparador. Interessantemente, outras nobres funções biológicas foram atribuídas a C5, sugerindo um envolvimento essencial na regeneração do fígado após injúria. Mastellos et al. (2001) mostraram que camundongos deficientes de C5 ($C5^{-/-}$), quando submetidos a uma injúria por tetracloreto de carbono (CCl_4), exibem regeneração hepática anormal, sendo mais suscetíveis a danos tóxicos no fígado do que animais C5 suficientes ($C5^{+/+}$). No entanto, quando camundongos $C5^{-/-}$ foram reconstituídos com a proteína C5 murina purificada regeneraram o tecido hepático, semelhantemente ao observado em camundongos C5 normais. Com isso, sugere-se que o sistema complemento apresente importante desempenho na manutenção da homeostase hepática e na resposta fisiológica do fígado pós-injúria tóxica, provocada pelo emprego do CCl_4 . O grupo de Markiewski (2004) observou o mesmo processo patológico em camundongos $C3^{-/-}$. Desta forma, fica evidente o papel crítico dos componentes C5 e C3 para a recuperação hepática após dano tóxico.

Em modelo de hepatectomia parcial, Strey et al. (2003) demonstraram que os fragmentos C3a e C5a, assim como seus respectivos receptores (C3aR e C5aR), são essenciais para a regeneração do fígado, promovendo a proliferação dos hepatócitos. Neste processo regenerativo estariam identificados como reguladores cruciais as citocinas interleucina (IL)-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , bem como os fatores de transcrição: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT-3) e o fator nuclear κB (NF- κB). Estes resultados foram novamente explorados e confirmados pelo grupo de Markiewski (2009), concluindo que os fragmentos C3a e C5a regulam a homeostase do fígado, em dependência de IL-6 e TNF- α .

1.6 Sistema complemento e esteatose hepática

A ativação do sistema complemento de forma exacerbada no tecido hepático frente aos mais variados tipos de injúria, como acima citados, é correlacionada com a progressão de várias patologias crônicas (HILLEBRANDT et al., 2005). Dentre as patologias crônicas e “silenciosas” que podem ser influenciadas pela ativação do sistema complemento está a Doença Hepática Alcoólica (DHA) (PRITCHARD et al., 2007) e a Doença Hepática Não Alcoólica (DHNA) (RENSEN et al., 2009), doenças caracterizadas primariamente pela deposição de lipídeos nos hepatócitos (esteatose), seguida de inflamação e fibrose que podem progredir, sem possibilidade de regressão, para a cirrose (NAGATA; SUZUKI; SAKAGUCHI, 2008).

1.6.1 Sistema Complemento na DHA

Apresentamos aqui um breve resumo dos principais trabalhos que investigaram o papel do sistema complemento na DHA, retomaremos este tema no **CAPÍTULO 2**. O primeiro estudo aplicando um modelo animal envolvendo a ativação do sistema complemento com a DHA foi realizado pelo grupo de Järveläinen, em 2002. Ratos foram tratados com uma dieta hiperlipídica contendo etanol por 4 a 6 semanas, e, após este período, observou-se deposição de C3 e esteatose no espaço porta hepático nos animais selvagens. Por outro lado, os ratos deficientes de C3 não apresentaram semelhante patologia.

Camundongos C3 deficientes também foram protegidos do depósito de gordura hepática após tratamento com dieta contendo etanol (BYKOV et al, 2006). Além disso, estudos onde camundongos C5 deficientes foram tratados com dieta hiperlipídica contendo etanol mostraram que estes animais apresentam menor produção de TNF- α e IL-6 hepáticos que os camundongos selvagens tratados com a mesma dieta, e camundongos CD59 deficientes apresentaram exacerbada esteatose hepática, assim como aumento de TNF- α e IL-6 hepáticos (PRITCHARD et al., 2007).

1.6.2 Sistema Complemento na DHNA

Em 2009, Rensen e colaboradores descreveram pela primeira vez o depósito de produtos de ativação do sistema complemento em biópsias hepáticas de pacientes com DHNA e com a forma mais avançada da doença chamada Esteatohepatite Não Alcoólica (ENA). Empregando a técnica de imunohistoquímica foram encontrados em pacientes com DHNA depósito de C3 e MBL ao redor dos hepatócitos com acúmulo de gordura, infiltrado neutrofílico e aumento da expressão gênica da quimiocina IL-8 e da citocina IL-6 no tecido hepático. Conseqüentemente, todas estas características tornaram-se mais pronunciadas nos pacientes com ENA.

Até o presente momento não existem trabalhos que abordem o sistema complemento em modelo murino de DHNA. Este tema será apresentado com mais detalhes no **APÊNDICE A**. Estes resultados foram direcionados para o **APÊNDICE A** devido ao grande volume de resultados obtidos com o modelo de DHA.

7 CONCLUSÕES GERAIS

7.1 Desenvolvimento e validação de duas linhagens congênicas de camundongos B6.A-Hc⁰ (C5 deficiente) e A.B6-Hc (C5 normal)

❖ As linhagens congênicas B6.A-Hc⁰ e A.B6-Hc foram desenvolvidas, avaliadas e validadas quanto ao genótipo, presença ou não de C5, atividade hemolítica de C5 quando presente e quanto ao fundo genético. Para isso realizamos pelo menos 10 retrocruzamentos.

7.2 Modelo de injúria hepática aguda induzida por etanol

❖ Houve redução do número de leucócitos totais em ambas as linhagens tratadas com etanol. Entretanto, apenas a linhagem A/J apresentou aumento no número de leucócitos PMN;

❖ Apenas os camundongos da linhagem A/J apresentaram aumento sérico significativo das enzimas associadas à função e integridade hepática AST, GGT e da citocina pró-inflamatória IL-6

7.3 Padronização do modelo de DHA empregando as linhagens B6 e A/J

Testamos 6, 8 e 10 semanas de tratamento. Realizamos a análise estatística destes resultados empregando ANOVA para dois fatores (tempo em semanas e parâmetros). Ou seja, analisamos o comportamento cinético (6, 8 e 10 semanas) dos parâmetros investigados para cada linhagem. O tempo de tratamento que evidenciou as diferenças entre as linhagens B6 e A/J foi 10 semanas. Dentre as principais conclusões obtidas estão:

❖ A linhagem A/J quando tratada com DH+E apresentou aumento significativo do número de leucócitos circulantes com o decorrer das semanas de tratamento;

❖ A razão entre o peso do fígado / peso corporal foi significativamente maior para os animais tratados com DH+E em todos os tempos avaliados e para as duas linhagens;

❖ O depósito de triglicerídeos hepáticos foi significativamente maior para os animais tratados com DH+E em todos os tempos e para as duas linhagens;

- ❖ A concentração da citocina hepática IL-6 decresceu significativamente no decorrer das semanas de tratamento com DH+E, tanto para a linhagem B6 quanto para A/J
- ❖ A concentração da citocina hepática IL-10 aumentou significativamente no decorrer das semanas de tratamento com DH+E apenas para a linhagem A/J;
- ❖ A concentração da citocina hepática IL-12 decresceu significativamente no decorrer das semanas de tratamento com DH+E, tanto para a linhagem B6 quanto para A/J;
- ❖ A produção de NO hepática aumentou significativamente no decorrer das semanas de tratamento com DH+E apenas para a linhagem A/J. E decresceu no decorrer das semanas de tratamento com DH+E para a linhagem B6;
- ❖ A histopatologia hepática mostrou elevado depósito de lipídeos hepáticos na linhagem B6 em relação à linhagem A/J quando tratadas com DH+E. Esse depósito intensificou-se com o aumento do tempo de tratamento.

De maneira geral concluímos com estes tratamentos que a linhagem A/J é mais protegida de desenvolver dano hepático que a linhagem B6 quando tratadas com etanol. É possível que esta característica foi promovida pela resposta inflamatória observada na linhagem, onde a ausência de C5 possivelmente foi um dos fatores que contribuíram para a proteção.

7.4 Aplicação da linhagem congênica B6.A-Hc⁰ no modelo de DHA

7.4.1 Independentemente do tratamento os camundongos da linhagem B6.A-Hc⁰ apresentaram em relação aos camundongos linhagem B6

- ❖ Houve aumento no número de leucócitos e na concentração de AST, FA, albumina, triglicerídeos, colesterol sérico e hepático;
- ❖ Houve menor glicemia e menores concentrações de IL-6, IL-12p70, IFN- γ .

7.4.2 Independentemente da linhagem, o tratamento com DH+E promoveu

- ❖ Houve aumento das concentrações de TNF- α , na produção de NO, acúmulo de triglicerídeos e colesterol hepático;
- ❖ Houve redução dos níveis de colesterol sérico.

7.4.3 Diferenças entre as linhagens quando tratadas com DH+E

- ❖ Observamos aumento da concentração de IL-1 β hepática na linhagem B6 e redução de IL-1 β na B6.A-Hc⁰;
 - ❖ Observamos aumento de IL-17 hepática na linhagem B6.A-Hc⁰;
 - ❖ Observamos aumento da concentração de IL-10 hepática na linhagem B6.A-Hc⁰,
 - ❖ Observamos aumento da concentração de TGF- β hepático na linhagem B6 e redução de TGF- β na B6.A-Hc⁰.
- ❖ A proteína C5 além de suas funções pró-inflamatórias, possivelmente, desempenha um papel importante na homeostase hepática e na manutenção dos parâmetros séricos aqui avaliados sob um contexto de dieta hiperlipídica: AST, FA, albumina, triglicerídeos, colesterol e glicose.**

REFERÊNCIAS *

- ADDIS-LIESER, E.; KOHL, J.; CHIARAMONTE, M. G. Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 1894-1902, 2005.
- ALAIISH, S. M.; TORRES, M.; FERLITO, M.; SUN, C. C.; DE MAIO, A. The severity of cholestatic injury is modulated by the genetic background. **Shock**, v. 24, n. 5, p. 412-416, 2005.
- ANDRADE, M. C.; MENESES, J. S.; CASSALI, G. D.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARA, D. C.; FARIA, A. M. C. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, p. 321-322, 2006.
- BABA, A.; FUJITA, T.; TAMURA, N. Sexual dimorphism of the fifth component of mouse complement. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 160, n. 2, p. 411-419, 1984.
- BHAVE, S. V.; HOFFMAN, P. L.; LASSEN, N.; VASILIOU, V.; SABA, L.; DEITRICH, R. A.; TABAKOFF, B. Gene array profiles of alcohol and aldehyde metabolizing enzymes in brains of C57Bl/6 e DBA/2 mice. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, n. 10, p. 1659-1669, 2006.
- BOÉ, D. M.; RICHENS, T. R.; HORSTMANN, S. A.; BURNHAM, E. L.; JANSSEN, W. J.; HENSON, P. M.; MOSS, M.; VANDIVIER, R. W. Acute and chronic alcohol exposure impairs the phagocytosis of apoptotic cells and enhances the pulmonary inflammatory response. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 34, n. 10, p. 1723-1732, 2010.
- BOONE, L.; MEYER, D. P.; CUSICK, P.; ENNULAT, D.; BOLLIGER, A. P.; EVERDS, N.; MEADOR, V.; ELLIOTT, G.; HONOR, D.; BOUNOUS, D.; JORDAN, H. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in pre clinical studies, **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 182-188, 2005.
- BURRAGE, L. C.; BASKIN-HILL, A. E.; SINASAC, D. S.; SINGER, J. B.; CRONIGER, C. M.; KIRBY, A.; KULBOKAS, E. J.; DALY, M. J.; LANDER, E. S.; BROMAN, K. W.; NADEAU, J. H. Genetic resistance to diet-induced obesity in chromosome substitution strains of mice. **Mammalian Genome**, v. 21, n. 3, p. 115-129, 2010.
- BYKOV, I.; JUNNIKKALA, S.; PEKNA, M.; LINDROS, K. O.; MERI, S. Effect of chronic ethanol consumption on the expression of complement components and acute phase proteins in liver. **Clinical Immunology**, v. 124, n. 2, p. 213-220, 2007.
- BYKOV, I.; JAUHAINEN, M.; OLKKONEN, V. M.; SAARIKOSKI, S. T.; EHNHOLM, C.; JUNNIKKALA, S.; VAKEVA, A.; LINDROS, K. O.; MERI, S. Hepatic gene expression and lipid parameters in complement C3(-/-) mice that do not develop ethanol-induced steatosis. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 5, p. 907-914, 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BYKOV, I.; JUNNIKKALA, S.; PENKA, M.; LINDROS, K. O.; MERI, S. Complement C3 contributes to ethanol-induced liver stasis in mice. **Annals of Medicine**, n. 38, p. 280-286, 2006.

BYKOV, I.; VÄKEVÄ, A.; JÄRVELÄINEN, H.; MERI, S.; LINDROS, K. O. Protective function of complement against alcohol-induced rat liver damage. **International Immunopharmacology**, n. 4, p. 1445-1454, 2004.

CAIN, S. A.; MONK, P. N. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7165-7169, 2002.

CARSON, E. J.; PRUETT, S. B. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of ethanol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, n. 1, p. 132-138, 1996.

CASPI, R. R. Th1 and Th2 responses in pathogenesis and regulation of experimental autoimmune uveoretinitis. **International Reviews of Immunology**, v. 21, n. 2, p. 197-208, 2002.

CHIANG, D. J.; PRITCHARD, M. T.; NAGY, L. E. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis. **The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 300, n. 5, p. 697-702, 2011.

CIANFLONE, K.; XIA, Z.; CHEN, L. Y. Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1609, p. 127-143, 2003.

COHEN, J. I.; ROYCHOWDHURY, S.; MCMULLEN, M.; STAVITSKY, A.; NAGY, L. E. Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. **Gastroenterology**, v. 139, p. 664-667, 2010.

COLLIER, S. D.; PRUETT, S. B. Mechanisms of suppression of poly I:C-induced activation of NK cells by ethanol. **Alcohol**, v. 21, n. 1, p. 87-95, 2000.

CSAK, T.; GANZ, M.; PESPIA, J.; KODYS, K.; DOLGANIUC, A.; SZABO, G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 133-144, 2011.

D'EUSTACHIO, P.; KRISTENSEN, T.; WETSEL, R. A.; RIBLET, R. J.; TAYLOR, B. A.; TACK, B. F. Chromosomal location of the genes encoding complement components C5 and factor H in the mouse. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 12, p. 3990-3995, 1986.

DAS, S. K.; BALAKRISHNAN, V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 202-209, 2011.

DENNY, K. J.; COULTHARD, L. G.; JEANES, A.; LISGO, S.; SIMMONS, D. G.; CALLAWAY, L. K.; WLODARCZYK, B.; FINNELL, R. H.; WOODRUFF, T. M.; TAYLOR, S. M. C5a Receptor signaling prevents folate deficiency-induced neural tube defects in mice. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3493-3499, 2013.

DIXON, L. J.; FLASK, C. A.; PAPOUCHADO, B. G.; FELDSTEIN, A. E.; NAGY, L. E. Caspase-1 as a central regulator of high fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. E56100, 2013.

DOMÍNGUEZ-PUNARO, M. L.; SEGURA, M.; RADZIOCH, D.; RIVEST, S.; GOTTSCHALK, M. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3901-3910, 2008.

EL-ASSAL, O.; HONG, F.; KIM, W. H.; RADAIEVA, S.; GAO, B. IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 1, n. 3, p. 205-211, 2004.

EMBER, J. A.; JAGELS, M. A.; HUGLI, T. E. Characterization of complement anaphylatoxins e their biological responses. In: VOLANAKIS, J. E.; FRANK, M.M. **The human complement system in health e disease**. New York: Marcel Dekker Inc., 1998. p. 241-284.

FISETTE, A.; MUNKONDA, M. N.; OIKONOMOPOULOU, K.; PAGLIALUNGA, S.; LAMBRIS, J. D.; CIANFLONE, K. C5L2 receptor disruption enhances the development of diet-induced insulin resistance in mice. **Immunobiology**, v. 218, n. 1, p. 127-133, 2013.

FONSECA, M. I.; AGER, R. R.; CHU, S. H.; YAZAN, O.; SANDERSON, S. D.; LA FERLA, F. M.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M.; TENNER, A. J. Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 1375-1383, 2009.

FRAULOB, J. C.; OGG-DIAMANTINO, R.; FERNANDES-SANTOS, C.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 212-223, 2010.

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M. S.; RABÈS, J. P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; TOMÉ, D.; JAIS, J. P.; JUNIEN, C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity**, v. 15, n. 8, p. 1996-2005, 2007.

GAO, B. Hepatoprotective and anti-inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 27, n. 2, p. 89-93, 2012.

GAO, H.; NEFF, F. A.; GUO, R.; SPEYER, C. L.; SARMA, J. V.; TOMLINS, S.; MAN, Y.; RIEDEMANN, N. C.; HOESEL, L. M. Evidence for a functional role of the second C5a receptor C5L2. **The FASEB Journal**, 2005.

GAUVREAU, D.; ROY, C.; TOM, F. Q.; LU, H.; MIEGUEU, P.; RICHARD, D.; SONG, W. C.; STOVER, C.; CIANFLONE, K. A new effector of lipid metabolism: complement factor properdin. **Molecular Immunology**, v. 51, n. 1, p. 73-81, 2012.

GERVAIS, F.; DESFORGES, C.; SKAMENE, E. The C5-sufficient A/J congenic mouse strain. Inflammatory response and resistance to *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Immunology**, v. 142, n. 6, p. 2057-2060, 1989.

GILL, K. J.; BOYLE, A. E. Genetic influences on drug-induced psychomotor activation in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 7, n. 8, p. 859-868, 2008.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GUO, R. F.; WARD, P. A role of C5a in inflammatory responses. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 821-852, 2005.

GUSTOT, T.; LEMMERS, A.; MORENO, C.; NAGY, N.; QUERTINMONT, E.; NICAISE, C.; FRANCHIMONT, E.; LOUIS, H.; DEVIERE, J.; LEMOINE, O. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver, **Hepatology**, v.43, p. 989-1000, 2006.

HASHIMOTO, M.; HIROTA, K.; YOSHITOMI, H.; MAEDA, S.; TERADAIRA, S.; AKIZUKI, S.; PRIETO-MARTIN, P.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, N.; KÖHL, J.; HEYMAN, B.; TAKAHASHI, M.; FUJITA, T.; MIMORI, T.; SAKAGUCHI, S. Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n.6, p. 1135-1143, 2010.

HAVILAND, D. L.; HAVILAND, J. C.; FLEISCHER, D. T.; WETSEL, R. A. Structure of the murine fifth complement component (C5) gene. A large, highly interrupted gene with a variant donor splice site and organizational homology with the third and fourth complement component genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 18, p. 11818-11825, 1991.

HAWLISCH, H.; BELKAID, Y.; BAELDER, R.; HILDEMAN, D.; GERARD, C.; KÖHL, J. C5a negatively regulates Toll-like receptor 4-induced immune responses. **Immunity**, v. 22, p. 415-426, 2005.

HEIJNEN, B. H. M.; STRAATSBURG, I. H.; PADILLA, N. D.; VAN MIERLO, G. J.; HACK, C. E.; VAN GULIK, T. M. Inhibition of classical complement activation attenuates liver ischaemia and reperfusion injury in a rat model. **Clinical and Experimental Immunology**, n. 143, p. 15-23, 2005.

HERNÁNDEZ-MIJARES, A.; JARABO-BUENO, M. M.; LÓPEZ-RUIZ, A.; SOLÁ-IZQUIERDO, E.; MORILLAS-ARIÑO, C.; MARTÍNEZ-TRIGUERO, M. L. Levels of C3 in patients with severe, morbid and extreme obesity: its relationship to insulin resistance and different cardiovascular risk factors. **International Journal of Obesity**, v. 31, n. 6, p. 927-932, 2007.

HIGUCHI, H.; KUROSE, I.; KATO, S.; MIURA, S.; ISHII, H. Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, n. 9, p. 340A-346A, 1996.

HILLEBRANDT, S.; WASMUTH, H. E.; WEISKIRCHEN, R.; HELLERBRAND, C.; KEPPELER, H. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 835-843, 2005.

HINES, I. N.; WHEELER, M. D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 2, p. 310-314, 2004.

HONG, F.; KIM, W. H.; TIAN, Z.; JARUGA, B.; ISHAC, E.; SHEN, X.; GAO, B. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. **Oncogene**, v. 21, n. 1, p. 32-43, 2002.

ICHIHARA, M.; HARA, T.; TAKAGI, M.; CHO, L. C.; GORMAN, D. M.; MIYAJIMA, A. Impaired interleukin-3 (IL-3) response of the A/J mice is caused by a branch point deletion in the IL-3 receptor alpha subunit gene. **The EMBO Journal**, v. 14, p. 939-950, 1995.

IIMURO, Y.; GALLUCCI, R. M.; LUSTER, M. I.; KONO, H.; THURMAN, R. G. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. **Hepatology**, v. 26, n. 6, p. 1530-1537, 1997.

INOHARA, N.; NUÑEZ, G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 5, p. 371-382, 2003.

JÄRVELÄINEN, H. A.; VÄKEVÄ, A.; LINDROS, K. O.; MERI, S. Activation of complement components and reduced regulator expressãõ in alcohol-induced liver injury in the rat. **Clinical Immunology**, v. 105, n. 1, p. 57-63, 2002.

JEREMIAH, S. J.; WEST, L. F.; DAVIS, M. B.; POVEY, S.; CARRITT, B.; FEY, G. Assignment of human complement component C5 to chromosome 9. (Abstract) **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 46, p. 634, 1987.

JEREMIAH, S. J.; WEST, L. F.; DAVIS, M.; POVEY, S.; CARRITT, B.; FEY, G. H. The assignment of the human gene coding for complement C5 to chromosome 9q22-9q33. **Annals of Human Genetics**, v. 52, p. 111-116, 1988.

KALANT, D.; MACLAREN, R.; CUI, W.; SAMANTA, R.; MONK, P. N.; LAPORTE, S. A.; CIANFLONE, K. C5L2 is a functional receptor for acylation-stimulating protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23936-23944, 2005.

KALANT, D.; CAIN, S. A.; MASLOWSKA, M.; SNIDERMAN, A. D.; CIANFLONE, K.; MONK, P. N. The Chemoattractant Receptor-like Protein C5L2 Binds the C3a des-Arg77/Acylation-stimulating Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 11123-11129, 2003.

KARP, C. L.; GRUPE, A.; SCHADT, E.; EWART, S. L.; KEANE-MOORE, M. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. **Nature Immunology**, v. 1, n. 3, 2000.

KAYE, M.; KUSY, R. P. Genetic lineage, bone mass, and physical activity in mice. **Bone**, v. 17, n. 2, p. 131-135, 1995.

KLEINER, D. E.; BRUNT, E. M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M. J.; CUMMINGS, O. W.; FERRELL, L. D.; LIU, Y. C.; TORBENSON, M. S.; UNALP-ARIDA, A.; YE, M.; MCCULLOUGH, A. J.; SANYAL, A. J. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1313-1321, 2005.

KLOS, A.; TENNER, A. J.; JOHNSON, K.; AGER, R. R.; REIS, E. S.; KÖHL, J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 14, p. 2753-2766, 2009.

KONDO, H.; MINEGISHI, Y.; KOMINE, Y.; MORI, T.; MATSUMOTO, I.; ABE, K. Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57Bl/6 mice. **American Journal of Physiological and Endocrinological Metabolism**, v. 291, p. 1092-1099, 2006.

KONDOS, S. C.; HATFALUDI, T.; VOSKOBOINIK, I.; TRAPANI, J. A.; LAW, R. H.; WHISSTOCK, J. C.; DUNSTONE, M. A.; KOTEISH, A.; DIEHL, A. M. Animal models of steatosis, **Seminars in Liver Disease**, v. 21, p. 89-104, 2001.

KRAWCZYK, M.; BONFRATE, L.; PORTINCASA, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 695-708, 2010.

LAMY, J.; BAGLIN, M. C.; FERRANT, J. P.; WEILL, J. Decrease in serum gamma-glutamyltranspeptidase following abstinence from alcohol. **Clinica Chimica Acta**, v. 56, n. 2, p. 169-173, 1974.

LASKIN, D. L.; SUNIL, V. R.; GARDNER, C. R.; LASKIN, J. D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 267-288, 2011.

LEE, H.; WHITFIELD, P. L.; MACKAY, C. R. Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. **Immunology and Cell Biology**, v. 86, n. 2, p. 153-160, 2008.

LEMMERS, A.; MORENO, C.; GUSTOT, T.; MARÉCHAL, R.; DEGRÉ, D.; DEMETTER, P.; DE NADAI, P.; GEERTS, A.; QUERTINMONT, E.; VERCRUYSSSE, V.; LE MOINE, O.; DEVIÈRE, J. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 646-657, 2009.

LIEBER, C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis, **Alcohol**, v. 34, p. 9-19, 2004.

LIEBER, C. S.; DECARLI, L. M. The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 6, n. 4, p. 523-531, 1982.

LIEBER, C. S.; JONES, D. P.; MENDELSON, J.; DECARLI, L. M. Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption despite adequate dietary intake. **Trans Ass Amer Physicians**, v. 76, p. 289-300, 1963.

LIM, J.; IYER, A.; SUEN, J. Y.; SEOW, V.; REID, R. C.; BROWN, L.; FAIRLIE, D. P. C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling. **FASEB Journal**, v. 27, n. 2, p. 822-831, 2013.

MACGREGOR, R. R. Alcohol and immune defense. **Journal of the American Medical Association**, v. 256, p. 1474-1479, 1986.

MALIK, T. H.; CORTINI, A.; CARASSITI, D.; BOYLE, J. J.; HASKARD, D. O.; BOTTO, M. The alternative pathway is critical for pathogenic complement activation in endotoxin- and diet-induced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. **Circulation**, v. 122, n. 19, p. 1948-1956, 2010.

MARKIEWSKI, M. M.; DE ANGELIS, R. A.; STREY, C. W.; FOUKAS, P. G.; GERARD, C.; GERARD, N.; WETSEL, R. A.; LAMBRIS, J. D. The regulation of liver cell survival by complement. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 5412-5418, 2009.

MARKIEWSKI, M. M.; DE ANGELIS, R. A.; BENENCIA, F.; RICKLIN-LICHTSTEINER, S. K.; KOUTOULAKI, A.; GERARD, C.; COUKOS, G.; LAMBRIS, J. D. Modulation of the antitumor immune response by complement. **Nature Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1225-1234, 2008.

MARKIEWSKI, M. M.; MASTELLOS, D.; TUDORAN, R.; DE ANGELIS, R. A. C3a and C3b Activation Products of the Third Component of Complement (C3) Are Critical for Normal Liver Recovery after Toxic Injury. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 747-754, 2004.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **The Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 229-265, 2009.

MASTELLOS, D.; PAPADIMITRIOU, J. C.; FRANCHINI, S.; TSONIS, P.; LAMBRIS, J. D. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 2479-2486, 2001.

MATTEONI, C. A.; YOUNOSSI, Z. M.; GRAMLICH, T.; BOPARAI, N.; LIU, Y. C.; MCCULLOUGH, A. J. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity, **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1413-1439, 1999.

MATTHEWS, K. W.; MUELLER-ORTIZ, S. L.; WETSEL, R. A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 11, p. 785-793, 2004.

MCCLAIN, C. J.; SONG, Z.; BARVE, S. S.; HILL, D. B.; DEACIUC, I. Recent advances in alcoholic liver disease IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, p. 497-502, 2004.

MENG, F.; WANG, K.; AOYAMA, T.; GRIVENNIKOV, S. I.; PAIK, Y.; SCHOLTEN, D.; CONG, M.; IWASAKO, K.; LIU, X.; ZHANG, M.; OSTERREICHER, C. H.; STICKEL, F.; LEY, K.; BRENNER, D. A.; KISSELEVA, T. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 765-776, 2012.

MIELE, L.; MARRONE, G.; LAURITANO, C.; CEFALO, C.; GASBARRINI, A.; DAY, C.; GRIECO, A. Gut-liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target. **Current Pharmaceutical Design**, 2013. In press.

MILLER, A. M.; WANG, H.; BERTOLA, A.; PARK, O.; HORIGUCHI, N.; KI, S. H.; YIN, S.; LAFDIL, F.; GAO, B. Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. **Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 846-856, 2011.

MILLER, G. W.; NUSSENZWEIG, V. Complement as a regulator of interactions between immune complexes and cell membranes. **Journal of Immunology**, v. 113, n. 2, p. 464-469, 1974.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.

MOLINA, P. E.; HAPPEL, K. I.; ZHANG, P.; KOLLS, J. K.; NELSON, S. Focus on: alcohol and the immune system. **Alcohol Research & Health**, v. 33, n. 1-2, p. 97-108, 2010.

MORGAN, B. P.; HARRIS, C. L. 1999. **Complement regulatory proteins**. Academic Press.

MORENO-NAVARRETE, J. M.; MARTÍNEZ-BARRICARTE, R.; CATALÁN, V.; SABATER, M.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; ORTEGA, F. J.; RICART, W.; BLÜHER, M. FRÜHBECK, G.; RODRÍGUEZ DE CORDOBA, S.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Complement factor H is expressed in adipose tissue in association with insulin resistance. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 200-209, 2010.

MORGAN, B. P.; GASQUE, P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? **Clinical and Experimental Immunology**, n. 107, p. 1-7, 1997.

MORIO, L. A.; CHIU, H.; SPROWLES, K. A.; LASKIN, D. L. Functional heterogeneity of rat hepatic and alveolar macrophages: effects of chronic ethanol administration. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 614-620, 2000.

MULLICK, A.; ELIAS, M.; PICARD, S.; BOURGET, L.; JOVCEVSKI, O.; GAUTHIER, S.; TUIE, A.; HARAKIDAS, P.; BIHUN, C.; MASSIE, B.; GROS, P. Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5868-5876, 2004.

MUNKONDA, M. N.; LAPOINTE, M.; MIEGUEU, P.; ROY, C.; GAUVREAU, D.; RICHARD, D.; CIANFLONE, K. Recombinant acylation stimulating protein administration to C3^{-/-} mice increases insulin resistance via adipocyte inflammatory mechanisms. **PLoS One**, n. 14, p. 1058-1066, 2012.

NAGATA, K.; SUZUKI, H.; SAKAGUCHI, S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis, **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 32, n. 5, p. 453-468, 2008.

NAGY, L. E. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p. 882-890, 2003.

NANJI, A.; TSUKAMOTO, H.; FRENCH, S. W. Relationship between fatty liver and subsequent development of necrosis, inflammation and fibrosis in experimental alcoholic liver disease. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 51, n. 2, p. 141-148, 1989.

NEFF, S.; NEFF, T. A.; KUNKEL, S. L.; HOGABOAM, C. M. Alterations in cytokine /chemokine expression during organ-to-organ communication established via acetaminophen-induced toxicity. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 75, p. 187-193, 2003.

NYBLOM, H.; BERGGREN, U.; BALLDIN, J.; OLSSON, R. High ast / alt ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. **Alcohol**, v. 39, n. 4, p. 336-339, 2004.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, p. 477-487, 2008.

OBERBACH, A.; BLÜHER, M.; WIRTH, H.; TILL, H.; KOVACS, P.; KULLNICK, Y.; SCHLICHTING, N.; TOMM, J. M.; ROLLE-KAMPCZYK, U.; MURUGAIYAN, J.; BINDER, H.; DIETRICH, A.; VON BERGEN, M. Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 10, p. 4769-4788, 2011.

OHNO, M.; HIRATA, T.; ENOMOTO, M.; ARAKI, T.; ISHIMARU, H.; TAKAHASHI, T. A. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 407-412, 2000.

OUCHTERLONY, Ö. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. In: KALLOS, P.; WAKSMAN, B. H. **Progress in allergy**. Basel: Karger, 1962. p. 30-154.

PAGLIALUNGA, S.; FISETTE, A.; YAN, Y.; DESHAIES, Y.; BROUILLETTE, J. F.; PEKNA, M.; CIANFLONE, K. Acylation-stimulating protein deficiency and altered adipose tissue in alternative complement pathway knockout mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 3, p. E521-529, 2008.

PASTORINO, J. G.; SHULGA, N.; HOEK, J. B. TNF-a-induced cell death in ethanol-exposed cells depends on p38 MAPK signaling but is independent of Bid and caspase-8. **The American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 285, p. G503-516, 2003.

PATEL, S. N.; BERGHOUT, J.; LOVEGROVE, F. E.; AYI, K.; CONROY, A.; SERGHIDES, L.; C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1133-1143. 2008.

PETKOV, P. M.; DING, Y.; CASSELL, M. A.; ZHANG, W.; WAGNER, G.; SARGENT, E. E.; ASQUITH, S., CREW, V., JOHNSON, K. A.; ROBINSON, P.; SCOTT, V. E.; WILES, M. V. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. **Genome Research**, v. 14, n. 9, p. 1806-1811, 2004.

PETRASEK, J.; BALA, S.; CSAK, T.; LIPPAI, D.; KODYS, K.; MENASHY, V.; BARRIEAU, M.; MIN, S. Y.; KURT-JONES, E. A.; SZABO, G. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 10, p. 3476-3489, 2012.

POURSHARIFI, P.; LAPOINTE, M.; PÉTRIN, D.; DEVOST, D.; GAUVREAU, D.; HÉBERT, T. E.; CIANFLONE, K. C5L2 and C5aR interaction in adipocytes and macrophages: insights into adipimmunology. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 4, p. 910-918, 2013.

POZZULO, G. N.; SKAMENE, E.; GERVAIS, F. Bone marrow cell response following induction of acute inflammation in different strains of mice. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 677-685, 1993.

PRITCHARD, M. T.; MCMULLEN, M. R.; STAVITSKY, A. B.; COHEN, J. I.; LIN, F.; MEDOF, M. E.; NAGY, L. E. Differential contributions of C3, C5 and decay accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. **Gastroenterology**, v.132, n.3, p. 1117-1126, 2007.

PRUETT, S. B.; FAN, R. Ethanol inhibits LPS-induced signaling and modulates cytokine production in peritoneal macrophages in vivo in a model for binge drinking. **BMC Immunology**, v. 18, p. 10-49, 2009.

RECINOS, A.; CARR, B. K.; BARTOS, D. B.; BOLDOGH, I.; CARMICAL, J. R.; BELALCAZAR, L. M.; BRASIER, A.R. Liver gene expression associated with diet and lesion development in atherosclerosis-prone mice: induction of components of alternative complement pathway. **Physiological Genomics**, v. 19, n. 1, p. 131-142, 2004.

RENSEN, S. S.; SLAATS, Y.; DRIESSEN, A.; PEUTZ-KOOTSTRA, K. J.; NIJHUIS, J.; Activation of the complement system in human non alcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 50, p. 1809-1817, 2009.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, p. 785-797, 2010.

ROY, C.; PAGLIALUNGA, S.; FISETTE, A.; SCHRAUWEN, P.; MOONEN-KORNIPS, E.; ST-ONGE, J.; HESSELINK, M. K.; RICHARD, D.; JOANISSE, D. R.; CIANFLONE, K. Shift in metabolic fuel in acylation-stimulating protein-deficient mice following a high-fat diet. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 294, n. 6, E1051-1059, 2008.

ROYCHOWDHURY, S.; MCMULLEN, M. R.; PRITCHARD, M. T.; HISE, A, G.; ROOIJEN, N. VAN. An early complement-dependent and TLR-4-independent phase in the

pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. **Hepatology**, v. 49, n. 3, p. 1326-1334, 2009.

RUSSELL, E. S.; MEIER, H. Constitutional diseases. In:_____. **Biology of the laboratory mouse**. 2nd ed. New York: Dover, 1966. p. 571-587.

SACKMANN-SALA, L.; BERRYMAN, D. E.; MUNN, R. D.; LUBBERS, E. R.; KOPCHICK, J. J. Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice. **Obesity**, v. 20, n. 1, p. 101-111, 2012.

SAEED, R. W.; VARMA, S.; PENG, T.; TRACEY, K. J.; SHERRY, B.; METZ, C. N. Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 6376-6383, 2004.

SAUNDERS, J. B.; WODAK, A. D.; WILLIAMS, R. What determines susceptibility to liver damage from alcohol?: discussion paper. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 77, n. 3, p. 204-216, 1984.

SCHEUER, P. J.; LEFKOWITCH, J. H. Drugs and toxins. In: SCHEUER, P. J.; LEFKOWITCH, J. H. (Ed.). **Liver biopsy interpretation**. London: WB Saunders, 2000. p. 134-150.

SCHMITT, J.; RODERFELD, M.; SABRANE, K.; ZHANG, P.; TIAN, Y., MERTENS, J. C.; FREI, P.; STIEGER, B.; WEBER, A.; MÜLLHAUPT, B., ROEB, E., GEIER, A. Complement factor C5 deficiency significantly delays the progression of biliary fibrosis in bile duct-ligated mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, n. 3, p. 445-450, 2012.

SELLERS, R. N.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p.751-755, 2007.

SERVAIS, G.; WALMAGH, J.; DUCHATEAU, J. Simple quantitative haemolytic microassay for determination of complement alternative pathway activation (AP50). **Journal of Immunological Methods**, v. 140, p. 93-100. 1991.

SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, 2007.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

SILVER, L. M. Laboratory mice. In:_____. **Mouse genetic: concepts and applications**. New York: Oxford, 1995. Cap. 3, p. 32-57.

STEWART, D.; FULTON, W. B.; WILSON, C.; MONITTO, C. L.; PAIDAS, C. N.; REEVES, R. H.; DE MAIO, A. Genetic contribution to the septic response in a mouse model. **Shock**, v. 18, n. 4, p. 342-347, 2002.

STIENSTRA, R.; SAUDALE, F.; DUVAL, C.; KESHTKAR, S.; GROENER, J.E.M.; VAN ROOIJEN, N. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor activity. **Hepatology**, v. 51, p. 511-522, 2010.

STREY, C. W.; MARKIEWSKI, M.; MASTELLOS, R. T.; SPRUCE, L. A.; GREENBAUM, L. E.; LAMBRIS, J. D. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 6, p. 913-923, 2003.

SURWIT, R. S.; SELDIN, M. F.; KUHN, C. M.; COCHRANE, C.; FEINGLOS, M. N. Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. **Diabetes**, v. 40, p. 82-87, 1991.

TACK, B. F.; MORRIS, S. C.; PRAHL, J. W. Fifth component of human complement: purification from plasma and polypeptide chain structure. **Biochemistry**, v.18, p.1490-1497, 1979.

TANG, Y.; BIAN, Z.; ZHAO, L.; LIU, Y.; LIANG, S.; WANG, Q.; HAN, X.; PENG, Y.; CHEN, X.; SHEN, L.; QIU, D.; LI, Z.; MA, X. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 166, n. 2, p. 281-290, 2011.

TAUB, R. Liver Regeneration: from myth to mechanism. **Nature Reviews**, v. 5, p. 836–847, 2004.

TOM, F. Q.; GAUVREAU, D.; LAPOINTE, M.; LU, H.; POURSHARIFI, P.; LUO, X. P.; CIANFLONE, K. Differential chemoattractant response in adipocytes and macrophages to the action of acylation stimulating protein.. **The European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 2, p. 61-69, 2013.

TSUKAMOTO, H. Fat paradox in liver disease. **The Keio Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p.190-192. 2005.

TUNG, K. H.; HUANG, Y. S.; YANG, K. C.; PERNG, C. L.; LIN, H. C.; LEE, S. D. Serum interleukin-12 levels in alcoholic liver disease. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 73, n. 2, p. 67-71, 2010.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, v.40, p. 423-429, 2003.

VALENTI, L.; FRACANZANI, A. L.; FARGION, S. The immunopathogenesis of alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis: two triggers for one disease? **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 3, p. 359-369, 2009.

VAN GREEVENBROEK, M. M; GHOSH, S.; VAN DER KALLEN, C. J.; BROUWERS, M. C.; SCHALKWIJK, C. G.; STEHOUWER, C. D. Up-regulation of the complement system in subcutaneous adipocytes from nonobese, hypertriglyceridemic subjects is associated with adipocyte insulin resistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 12, p. 4742-4752, 2012.

VIDALI, M.; HIETALA, J.; OCCHINO, G.; IVALDI, A.; SUTTI, S.; ALBANO, E.; NIEMELÄ, O. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor- α in heavy drinkers. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 45, p. 306–311, 2008.

WAKELAND, E.; MOREL, L.; ACHEY, K.; YUI, M.; LONGMATE, J. Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking). **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 472-477, 1997.

WALPORT, M. J. Complement (First of Two Parts). **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001.

WALPORT, M. J. Complement (Second of Two Parts). **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1140-1144, 2001.

WARD, P. Role of the complement in experimental sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 467-470, 2008.

WEISS, P. A.; COLLIER, S. D.; PRUETT, S. B. Role of glucocorticoids in ethanol-induced decreases in expression of MHC class II molecules on B cells and selective decreases in spleen cell number. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 139, n. 1, p. 153-162, 1996.

WETSEL, R. A. C5. In: MORLEY, B. J.; WALPORT, M. J. (Org.). **The complement: facts book**. London: Academic Press, 2000. p. 104-109.

WETSEL, R. A.; LEMONS, R. S.; LE BEAU, M. M.; BARNUM, S. R.; NOACK, D.; TACK, B. F. Molecular analysis of human complement component C5: localization of the structural gene to chromosome 9. **Biochemistry**, v.27, p. 1474-1482, 1987.

WETSEL, R. A.; FLEISCHER, D. T.; HAVILAND, D. L. Deficiency of the murine fifth complement component (C5): a 2-base pair gene deletion in a 5-prime-exon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 2435-2440, 1990.

WHITFIELD, J. B. Gamma glutamyl transferase. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 38, n. 4, p. 263-355, 2001.

WONG, G. T. Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strain. **Neuropeptides**, v. 36, p. 230-236, 2002.

WOODRUFF, T. M.; AGER, R. R.; TENNER, A. J.; NOAKES, P. G.; TAYLOR, S. M. The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system. **NeuroMolecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 179-192, 2010.

WRIGHT, E. K.; GOODART, S. A.; GROWNEY, J. D.; HADINOTO, V.; ENDRIZZI, M. G.; LONG, E. M.; SADIGH, K.; ABNEY, A. L.; BERNSTEIN-HANLEY, I.; DIETRICH, W. F. Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. **Current Biology**, v. 13, n. 1, p. 27-36, 2003.

XIA, Z.; CIANFLONE, K.; Acylation-stimulating protein precursor proteins in adipose tissue in human obesity. **Metabolism**, v. 52, n. 10, p. 1360-1366, 2003.

YIN, H.; KIM, M.; KIM, J.; KONG, G.; KANG, K.; KIM, H.; YOON, B.; LEE, M.; LEE, B. Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p. 225-233, 2007.

YONEYAMA, N.; CRABBE, J. C.; FORD, M. M.; MURILLO, A.; FINN, D. A. Voluntary ethanol consumption in 22 inbred mouse strains. **Alcohol**, v. 42, n. 3, p. 149-160, 2008.

ZHANG, J.; WRIGHT, W.; BERNLOHR, D. A.; CUSHMAN, S. W.; CHEN, X. Alterations of the classic pathway of complement in adipose tissue of obesity and insulin resistance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 5, p. 1433-1440, 2007.

ZHANG, P.; BAGBY, G. J.; HAPPEL, K. I. Pulmonary host defenses and alcohol. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1314-1330, 2002.

ZHANG, P.; WELSH, D. A.; SIGGINS, R. W.; BAGBY, G. J.; RAASCH, C. E.; HAPPEL, K. I.; NELSON, S. Acute alcohol intoxication inhibits the lineage- c-kit⁺ Sca-1⁺ cell response to *Escherichia coli* bacteremia. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 3, p. 1568-1576, 2009.