



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

*Modelos Experimentais de Esteatose
Hepática não alcoólica:
Modulação pela Dieta*

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Alceu Afonso Jordão Jr.



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

• Tópicos da aula:

- ❖ Esteatose hepática não alcoólica 
- ❖ Definições e Prevalência
- ❖ Papel da Dieta e dos Radicais Livres
- ❖ Padronização da dieta
 - ❖ Métodos Laboratoriais utilizados
- ❖ Modificações na dieta: Lipídios e Carboidratos
- ❖ Modificações na dieta: Outros Nutrientes
- ❖ Conclusões e Perspectivas Futuras



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

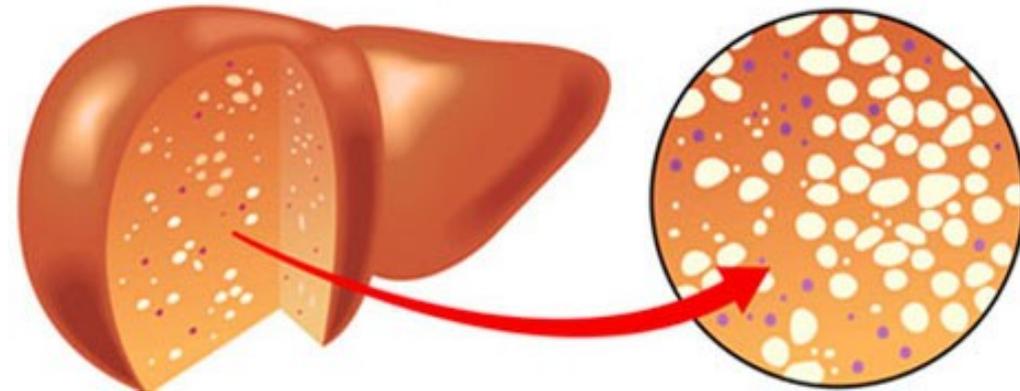
Universidade de São Paulo

• **Objetivos da aula:**

- Definir a esteatose hepática não alcoólica, sua magnitude, evolução e os principais fatores indutores
- Discorrer sobre a escolha do modelo dietético e os principais marcadores laboratoriais utilizados
- Exemplificar com dados do nosso grupo utilizando a modulação dietética na indução ou prevenção da esteatose.
 - Fechamento com perspectivas futuras

Definição: Esteatose Hepática não-alcoólica

Figado Gorduroso



Desequilíbrio nas células hepáticas, com incorporação citoplasmática macro e/ou micro vesicular ou ambos, primariamente na forma de triacilgliceróis em indivíduos que consomem etanol em até de 30g/dia para homens e 20 g/dia para mulheres, excluindo outras causas, como uso de drogas, infecção viral ou exposição a toxinas.

(Dietrich; Hellerbrandt, 2014)

Esteatose Hepática: Evolução Clássica

Teoria dos dois “hits” levando da esteatose (NAFLD) para esteato-hepatite (NASH)

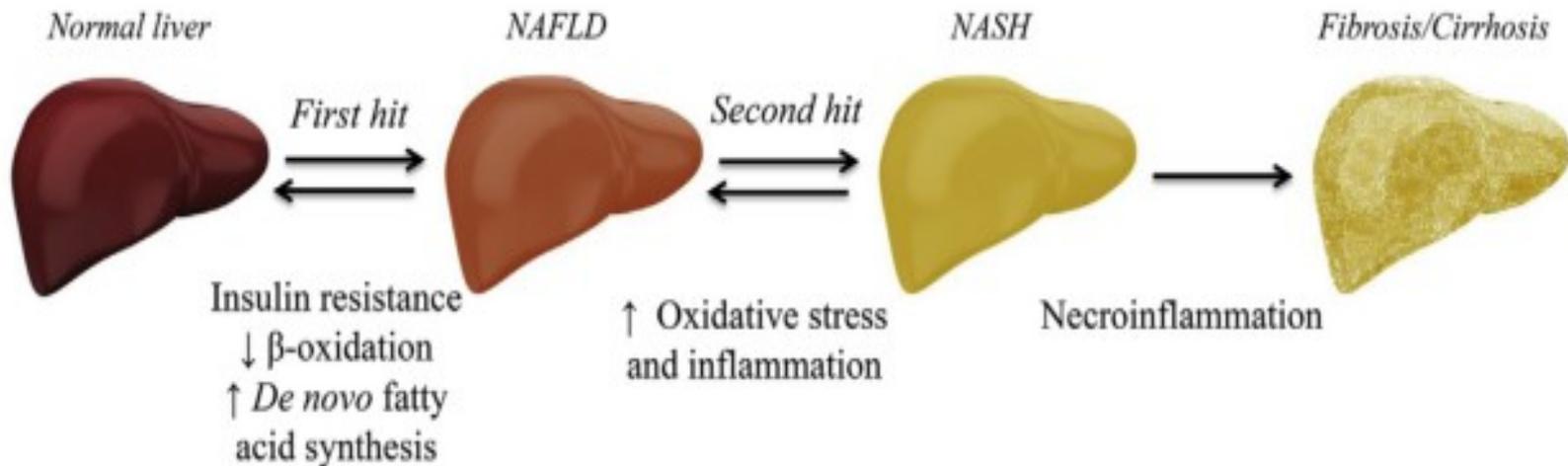
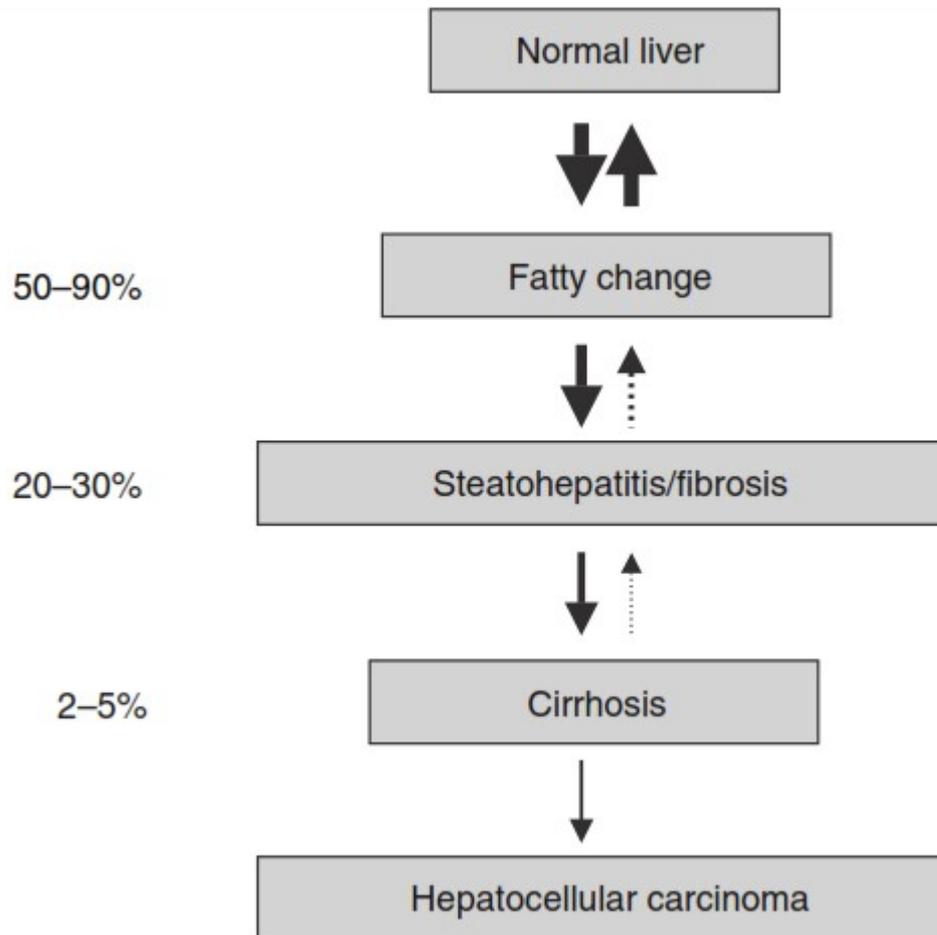


Fig. 1. The progression of NAFLD showing the first and second hits.

Esteatose Hepática: Evolução



Quanto mais avançado o estágio da doença mais difícil a reversão

Esteatose Hepática – Magnitude ocidente

Table 1 Magnitude of NAFLD—Summary of Western Perspective.

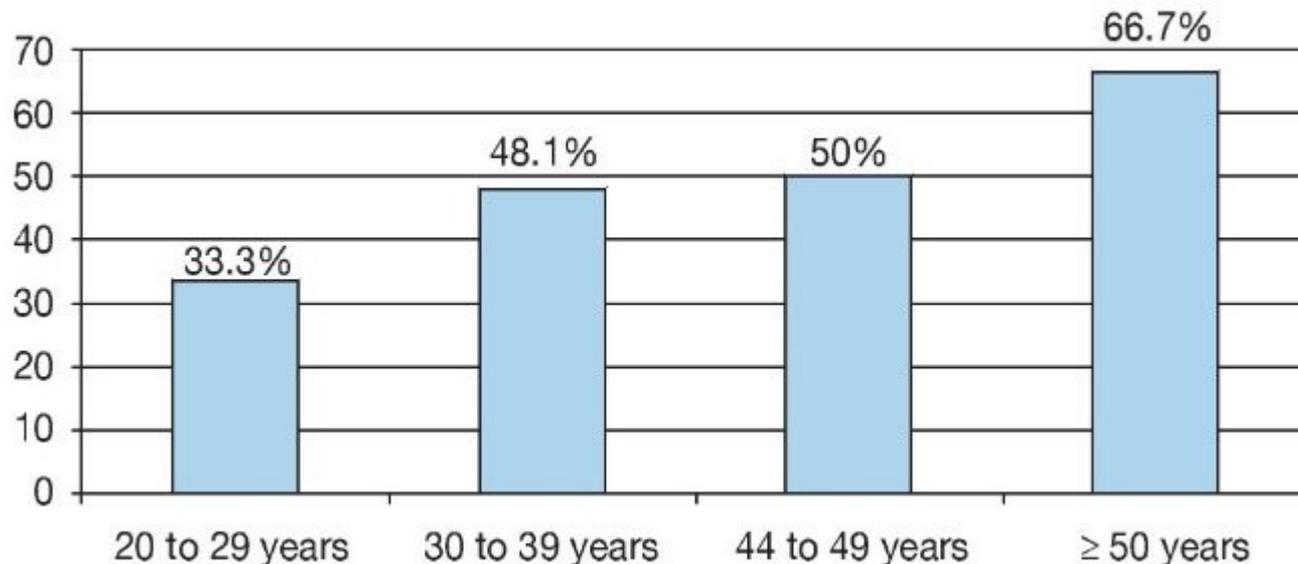
Magnitude of NAFLD	Frequencies ^a	Reference
Prevalence of NAFLD in the USA	24%	2, 6
Prevalence of NAFLD in South America	31%	2, 6
Prevalence of NAFLD in Europe	23.71%	2, 6
NAFLD prevalence in Hispanic-Americans	24.1%	2, 6
NAFLD prevalence in African Americans	13.5%	2, 6
Lifetime cost of patients with NASH (in 2017 US\$)	222.6	3
<i>Prevalence of NAFLD risk factors</i>		
Obesity	39.8%	21
Diabetes	9.8%	23
Chronic kidney disease	6.9%	70
Obstructive sleep apnea	6.5%	41, 42

Estados Unidos (2016): 64 milhões de pessoas com esteatose e 6,65 milhões com NASH

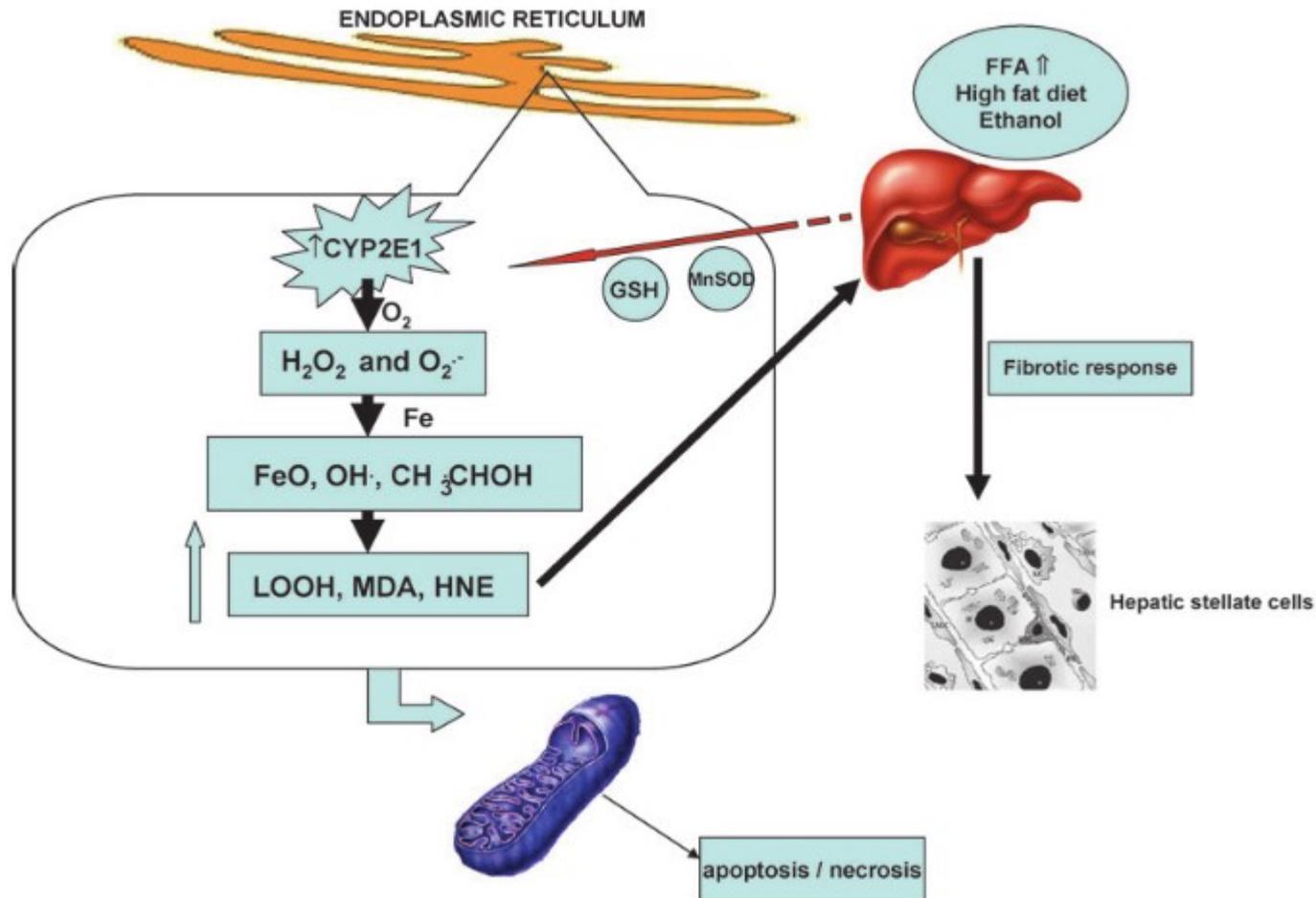
Esteatose Hepática: Magnitude Brasil

- Prevalência na população em geral: Esteatose 6-33% e NASH 3 a 5%, dados extremamente variáveis, depende da metodologia

Prevalência de Esteatose no grupo de obesos candidatos para cirurgia bariátrica (Brasil, 2013)

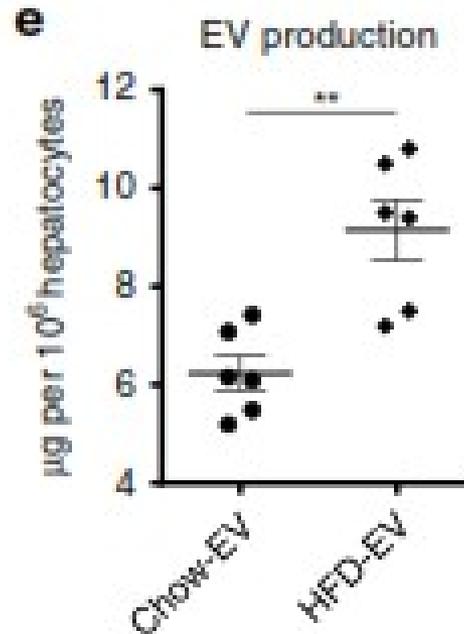
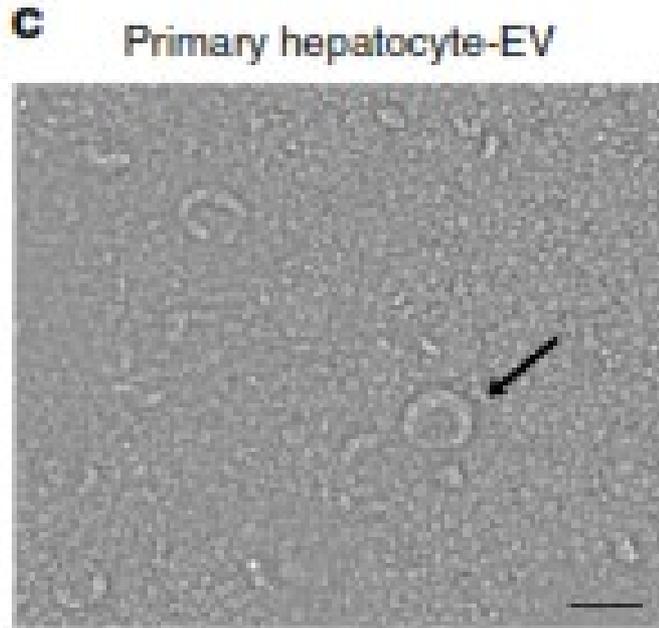


Esteatose Hepática: Radicais Livres



Aumento de espécies reativas de oxigênio e diminuição de enzimas antioxidantes

Esteatose Hepática: Consequências



Maior
produção
com dieta
hiperlipídica

Hepatócitos liberam vesículas (extra-hepáticas) com alto poder inflamatório, levando a esteatose do miocárdio ou aumento de gordura renal

Nat Commun 11, 719; (2020).
Journal of Hepatology 72, 156-166; 2020.

Esteatose Hepática: Considerações

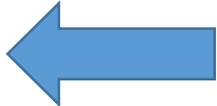
- ✓ **Papel fundamental da dieta**
- ✓ **Influência da Síndrome Metabólica**
- ✓ **Radicais livres e inflamação na progressão da doença**
- ✓ **Evolução para fibrose, cirrose e carcinoma hepático**
- ✓ **Repercussões renais e cardíacas**



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

• Tópicos da aula:

- ❖ Esteatose hepática não alcoólica
 - ❖ Definições e Prevalência
 - ❖ Papel da Dieta e dos Radicais Livres
- ❖ Padronização da dieta 
 - ❖ Métodos Laboratoriais utilizados
- ❖ Modificações na dieta: Lipídios e Carboidratos
- ❖ Modificações na dieta: Outros Nutrientes
- ❖ Conclusões e Perspectivas Futuras

Definindo as Dietas Experimentais

- **Buscamos definir o melhor modelo de oferta de dieta para o modelo experimental proposto.**
- **Temos a disposição dietas:**
 - **Purificadas: feita de ingredientes padronizados como caseína e mix de vitaminas e minerais, sendo esta a dieta recomendada AIN-93;**
 - **Comercial: Dietas baseadas em cereais, provenientes de fontes naturais.**

Comparação de dietas: AIN-93 e Comercial

NUTRIENTE	AIN-93	DIETA COMERCIAL
Arginina (g/kg)	6,4	16,0
Glicina (g/kg)	3,2	9,7
Ferro (mg/kg)	45	338,10
Zinco (mg/kg)	38	113
Vitamina E (mg/kg)	15000	50,81
Vitamina A (mg/kg)	500.000	4,10
Vitamina D3 (mg/kg)	400.000	0,90
Colina (mg/kg)	1000	11400
Ác. Linoleico (mg/kg)	35700	27248



AIN – 93

Comercial



Comparação de dietas AIN-93 e Comercial

- Dieta comercial com maiores teores de:
 - Glicina e Colina (nutrientes anti-esteatóticos)
 - Ferro (formação de radicais livres)
- Dieta comercial com menores teores de:
 - Vitamina E (antioxidante, anti-esteatótica)
- Peroxidação lipídica no fígado de camundongos:
 - AIN-93 = 0,92 nmol/g
 - Dieta comercial = 3,16 nmol/g

**Definição de um modelo dietético padronizado para
experimentação animal.**

Diferentes marcadores laboratoriais

- Estresse Oxidativo: Envolvimento dos radicais livres e antioxidantes na evolução da esteatose hepática, danos aos lipídios, proteínas e DNA.
 - Laboratório de Nutrição e Metabolismo – FMRP/USP
- Histopatologia: Avaliação do grau de esteatose hepática, a arquitetura hepática e a ocorrência de inflamação
 - Departamentos de Patologia e Biologia Celular da FMRP/USP
- Biologia Molecular: Expressão de genes relacionados as vias metabólicas estudadas
 - Laboratório Multiusuário da FMRP/USP



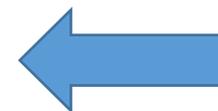


Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

• Tópicos da aula:

- ❖ Esteatose hepática não alcoólica
 - ❖ Definições e Prevalência
 - ❖ Papel da Dieta e dos Radicais Livres
- ❖ Padronização da dieta
 - ❖ Métodos Laboratoriais utilizados
- ❖ Modificações na dieta: Lipídios e Carboidratos
- ❖ Modificações na dieta: Outros Nutrientes
- ❖ Conclusões e Perspectivas Futuras



Dieta: Conteúdo Lipídico

- Modelo inicial com o uso da banha de porco.
- Modulações usando diferentes fontes lipídicas:
- Óleos de peixe, soja, canola e coco.
- Triglicerídeos de cadeia média
- Gordura Vegetal Hidrogenada
- Ácido Linoleico Conjugado....



Dieta Hiperlipídica – Banha de Porco

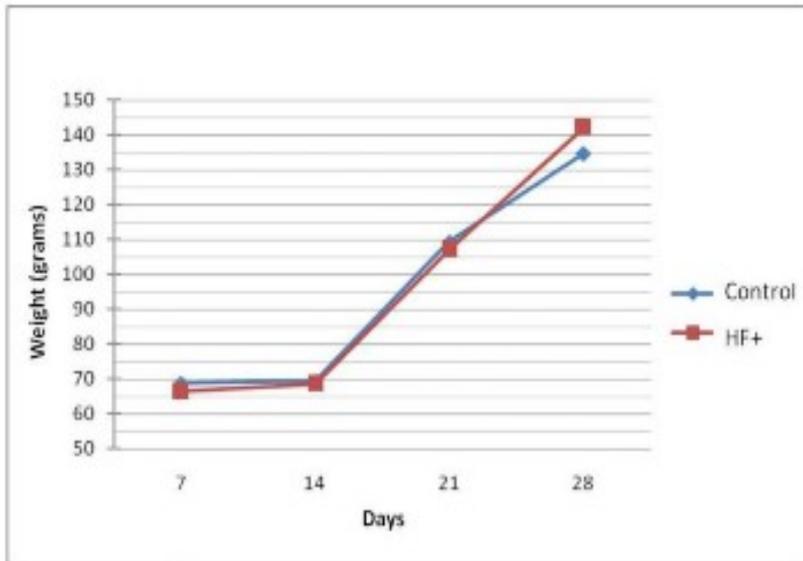


FIGURE 1 - Mean variation of weekly weight in the Control and High-fat (HF+) groups

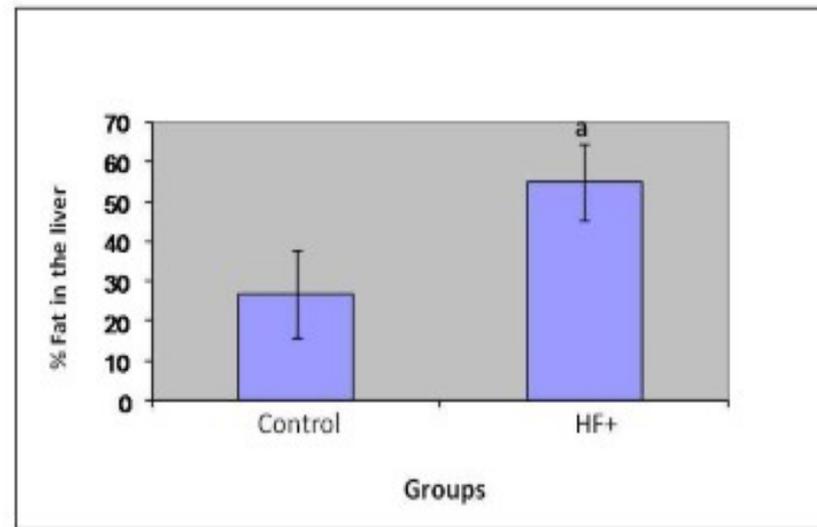


FIGURE 3 - Comparison of mean hepatic fat in the two groups HF + = high-fat group
a: $p < 0.002$ compared to control group.

Modelo de Esteatose, sem obesidade , com 50% de banha na dieta por 28 dias em ratos Wistar.

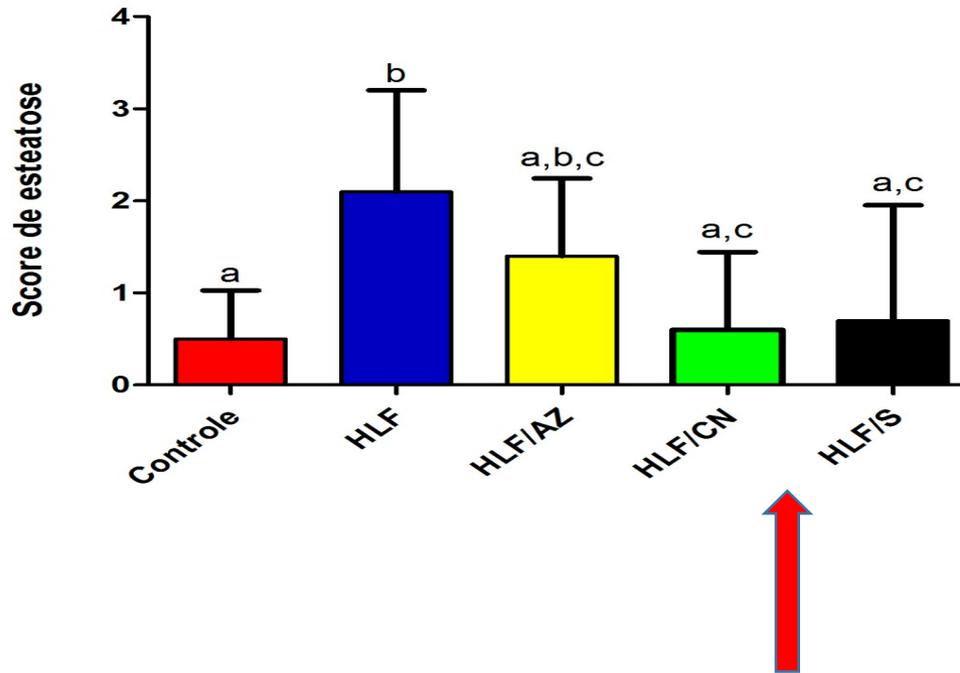
Gorduras: Saturada x Hidrogenada

- Modelo comparando banha com gordura vegetal hidrogenada
- Maior acúmulo de colesterol e triglicerídeos no fígado e
- Maior incorporação de ácidos graxos tipo “Trans” no fígado e adipócitos, com o uso da gordura vegetal hidrogenada.
- Isto não ocorreu, por exemplo, com margarina “trans-free” ou enriquecida com ômega-3.

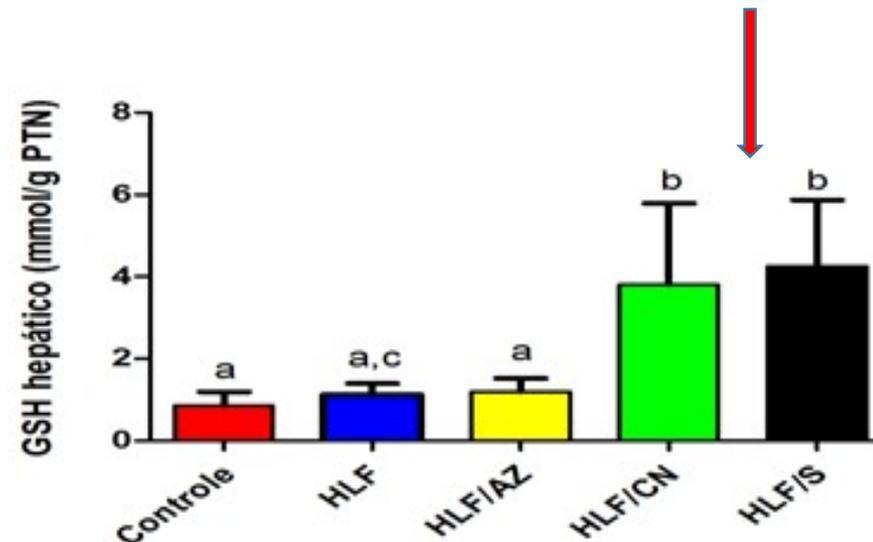
Dieta Hiperlipídica: Diferentes óleos

- Modelo com banha 50% e frutose 20%, por 16 semanas em camundongos C57BL/6
- Azeite extra virgem (25%): aumento do triglicerídeos séricos.
- Óleo de canola (25%): incorporação de Ômega- 3 e EPA, diminuição da esteatose e melhora nos antioxidantes
- O óleo de soja (25%): redução da esteatose, melhora nos antioxidantes mas com aumento de colesterol total e redução de HDL-c séricos.

Dieta Hiperlipídica: Diferentes óleos



Esteatose e defesa antioxidante com Canola ou Soja (Glutathiona reduzida).

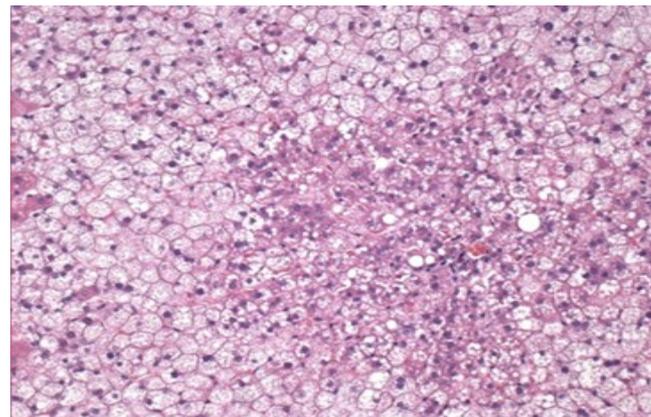


Manca CS, et al. Effects of different fatty acids on the prevention of nonalcoholic fatty liver disease in mice C57/BL fed a high-lipid and fructose-rich diet. Artigo em redação.

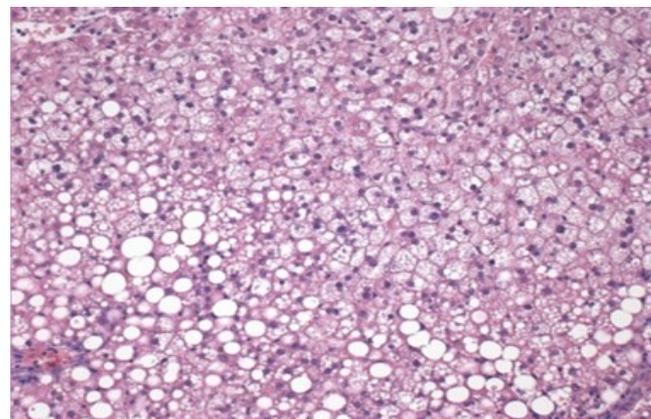
Dieta Hiperlipídica x Óleo de Coco

Óleo de Coco:

- ✓ Colesterol Hepático menor
- ✓ Triglicerídeos Hepáticos aumentados (2x)
- ✓ Menor Peroxidação Lipídica
- ✓ Esteatose óleo de coco = 45%
- ✓ Esteatose Banha = 40%



**Banha
50%**



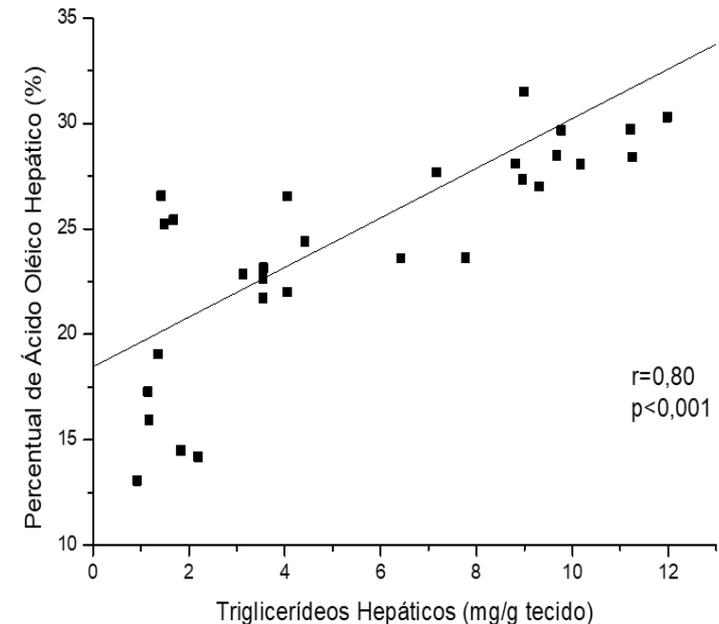
**Banha
25%
Coco
25%**



Jordão et al. Efeitos metabólicos do óleo de coco na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos. Artigo em redação.

Hiperlipídica: Triglicerídeos de Cadeia Média

- Triglicerídeos de Cadeia Média (25%), por 60 dias:
- Esteatose Hepática
 - 110 mg/g tecido grupo banha
 - 150 mg /g tecido grupo TCM
- Vitamina E hepática:
 - 9 nmol/g tecido grupo banha
 - 102 nmol/g tecido grupo TCM



Correlação incorporação ácido oléico e triglicerídeos hepáticos

Dieta Hiperlipídica: CLA modelo agudo

Linoleic Acid
(*cis-9, cis-12* octadecadienoic acid)



CLA (conjugated linoleic acid)
(*cis-9, trans-11* conjugated diene)



Trans Fatty Acid
(*trans-11* octadecenoic acid)



Stearic Acid
(**octadecanoic acid**)

- Ácido linoleico conjugado (CLA): perda de gordura e ganho de massa muscular
- Modelo de realimentação após 48 horas de jejum, em ratos recebendo dieta com 20% de gordura animal ou 20% de CLA

de Castro GS et al. Refeeding with conjugated linoleic acid increases serum cholesterol and modifies the fatty acid profile after 48 hours of fasting in rats. Nutr Hosp. 2014 Dec 1;30(6):1303-12.

Dieta Hiperlipídica: CLA modelo agudo

Oferta de Ácido linoleico conjugado (CLA):

- ✓ CLA incorporado no fígado e tecido adiposo, inclusive forma “trans”
- ✓ um menor ganho de peso total e hepático.
- ✓ aumento do colesterol e vitamina E no soro
- ✓ diminuição da vitamina E hepática
- ✓ Piora dos parâmetros antioxidantes

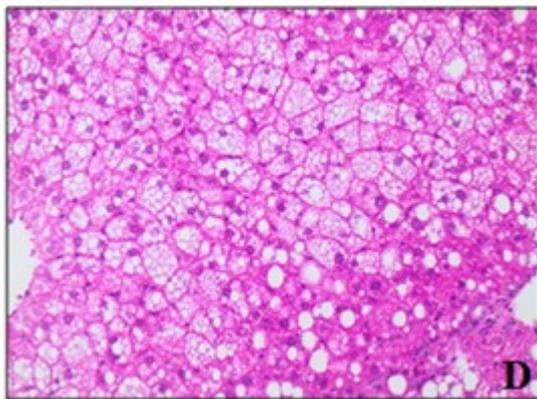
Dieta Hiperlipídica: CLA modelo crônico

Dietas banha ou controle com 3% de CLA por 30 dias:

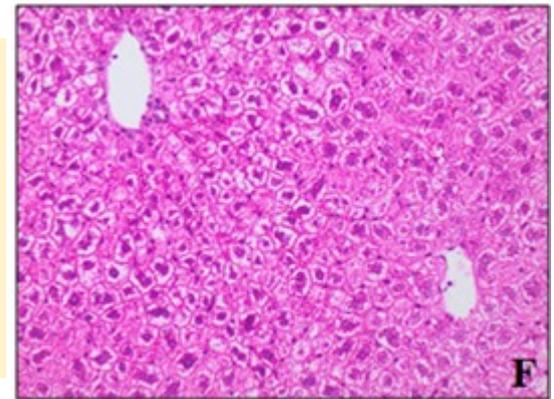
- Maior resistência a insulina,
- Esteatose e balonização nos grupos com CLA
- Ácidos graxos saturados no fígado e no tecido adiposo
- Maior incorporação de CLA no grupo controle (4% de soja e 3% de CLA)

Dieta Hiperlipídica: Futooligossacarídeo

- C57BL/6 por 18 semanas dietas rica em gordura animal (45%) com frutooligossacarídeo (15%).
- FOS preveniu esteatose, melhora dos antioxidantes
- Preservou a espessura muscular intestinal.
 - Controle 59 μm , Hiperlipídica 08 μm , HL + FOS 41 μm .

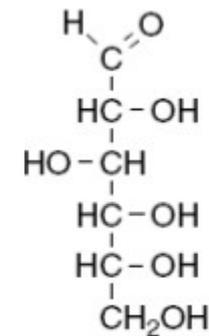


Esteatose:
← **Hiperlipídica**
HL + FOS →

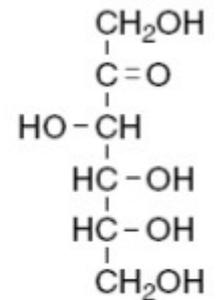


Dieta: Conteúdo de Carboidratos

- Alterações quantitativas e ou qualitativas no conteúdo de carboidratos
- Efeitos tanto na indução da esteatose hepática, como na prevenção.

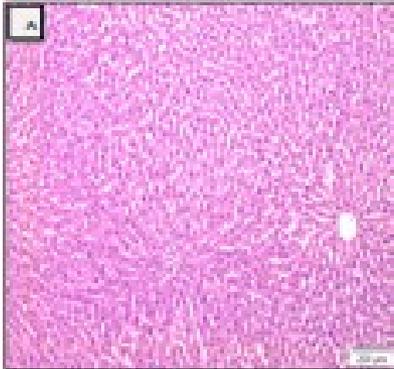


D-glicose

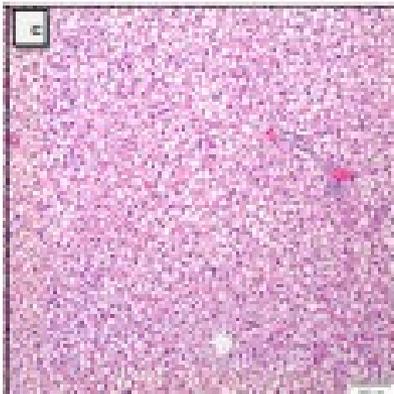


D-frutose

Jejum e Realimentação com Frutose



Jejum



Frutose

- Ratos em jejum (48 horas)
- Realimentados com dieta rica em frutose (24 ou 48 horas), em substituição a sacarose
- Esteatose hepática pronunciada
- Modelo de indução de modo agudo

Realimentação: Frutose e óleo de peixe

- Modulação distinta de metabolismo lipídico hepático tanto pela frutose como pelo óleo de peixe.
- Frutose aumenta TAG hepáticos e séricos.

- Dieta prévia com óleo de peixe por 7 dias (7%)
- Incorporação de ácidos graxos essenciais no fígado (ômega-3)
- Maior peroxidação lipídica.
- Fatty Acid synthase com expressão diminuída.

Modelo Crônico: Frutose e Óleo de peixe

Frutose por 60 dias levou a esteatose hepática, grupos com adição de óleo de peixe (7%):

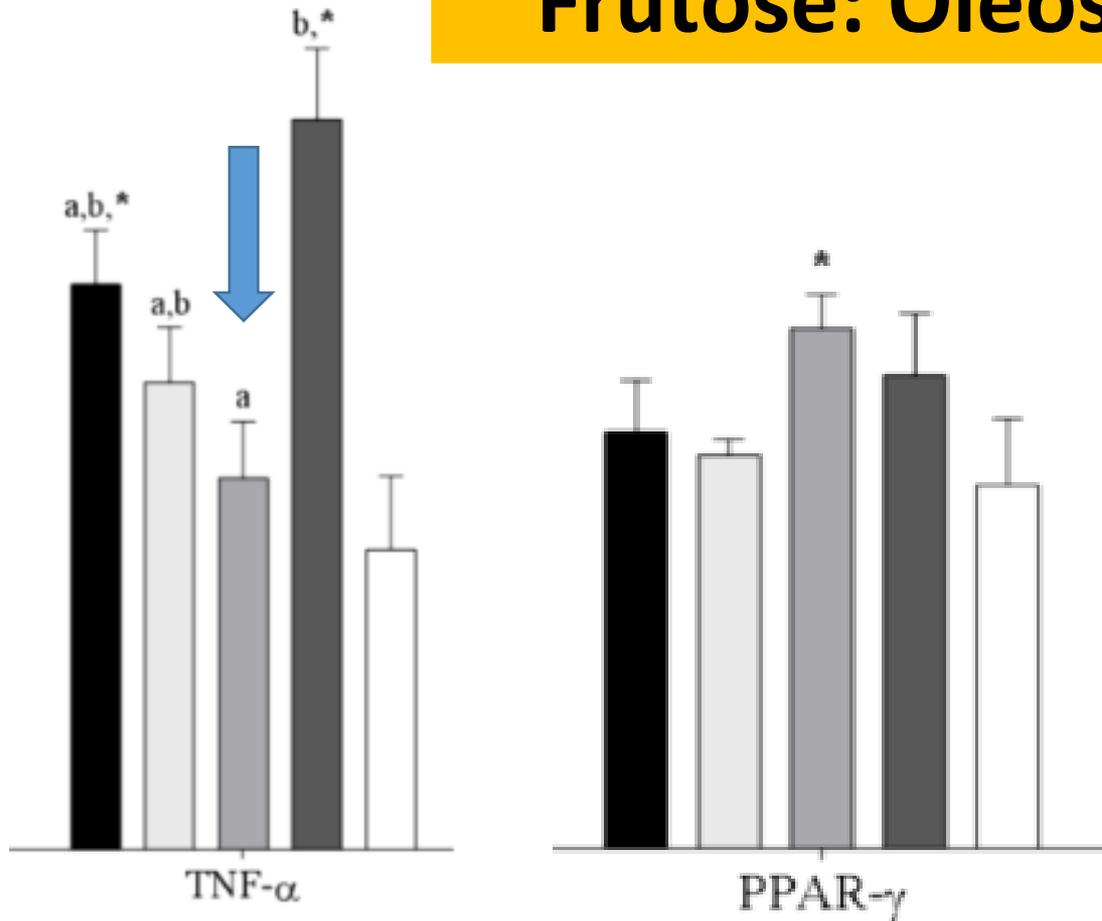
- ✓ Melhora na tolerância a glicose
- ✓ Incorporação de ácidos graxos distintos: EPA e DHA hepáticos
- ✓ Aumentou o estresse oxidativo e o dano oxidativo ao DNA hepático.
- ✓ Existe a necessidade de balanço com outros óleos? Razão ômega-3 / ômega-6 na dieta?

Modelo Crônico: Óleos de peixe e soja

Óleo de peixe (5%) associado com óleo de soja (2%):

- Reversão dos efeitos adversos da dieta rica em frutose.
- Uma proporção equilibrada de n-6/n-3,
- Modulação positiva da expressão gênica
- Melhor sensibilidade à insulina
- Melhora lipídios hepáticos
- Não houve aumento do estresse oxidativo.

Frutose: Óleos de peixe e soja



Frutose 63%

Frutose+ 2% OP + 5%

Soja

Frutose + 5% OP + 2%

Soja

Frutose + 7% OP

Controle + 7% Soja

Expressão Gênica: Efeitos diferentes do óleo de peixe adicionado em 2%, 5% ou 7%, p.ex. no TNF-alfa e PPAR-gama

de Castro GS, et al. Dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid influence liver triacylglycerol and insulin resistance in rats fed a high-fructose diet. *Mar Drugs*. 2015;13(4):1864–1881

Realimentação com Sacarose ou Banha

Modelo agudo de indução da Esteatose Hepática

Através do jejum e da realimentação com lipídio ou carboidrato.

Verificamos a ocorrência de duas situações distintas:

- 1. Esteatose hepática (dieta rica em lipídio)**
- 2. Síndrome de Realimentação (dieta rica em sacarose).**

Realimentação com Sacarose ou Banha

Ratos Wistar adultos: Delineamento Experimental

Grupo Controle (C)

Grupo Jejum (J) = 48 horas

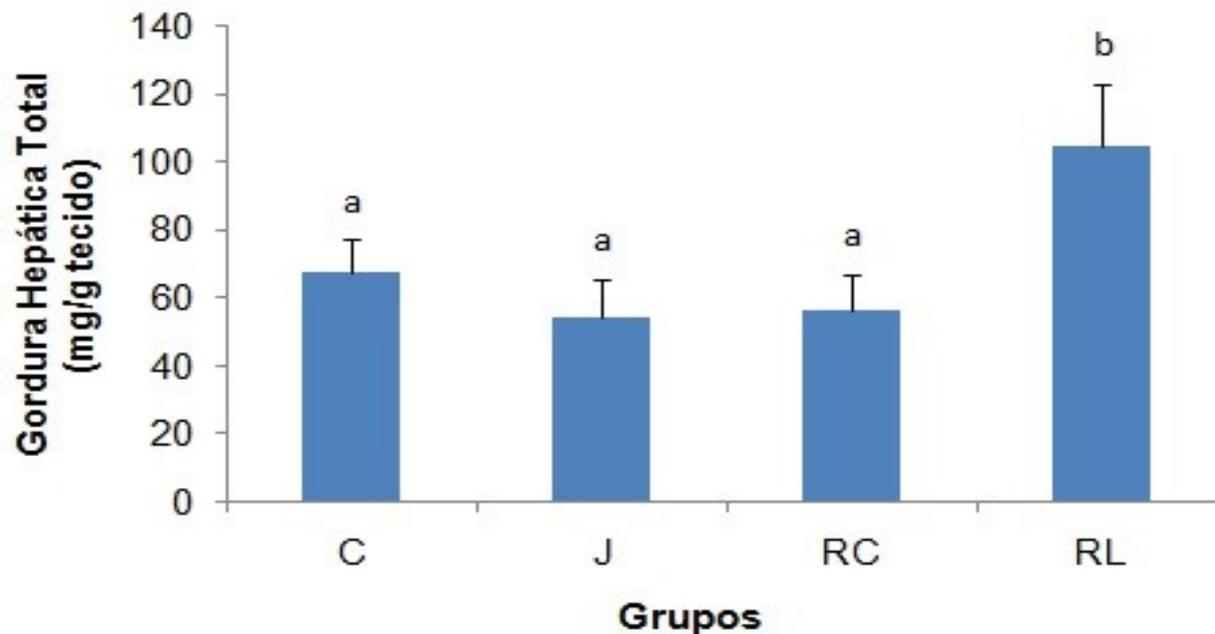
Grupo Realimentação com Carboidrato - Sacarose (RC)

Grupo Realimentação com Lipídeo – Gordura Animal (RL)

Realimentação feita por 48 horas

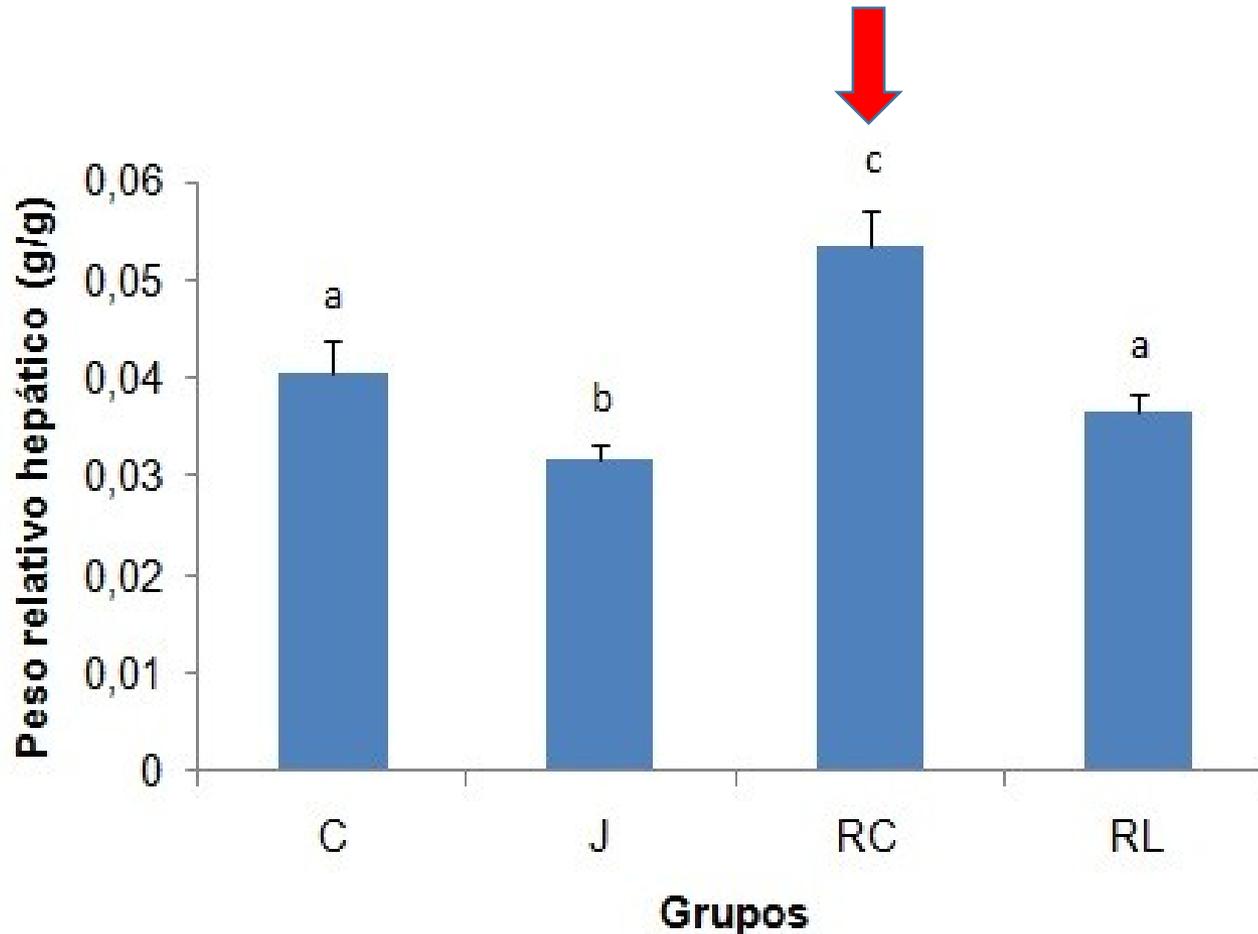
Realimentação com Sacarose ou Banha

Apenas a realimentação com dieta rica em banha acarretou níveis maiores de gordura hepática



C = Controle
J = Jejum
RC = Sacarose
RL = Banha

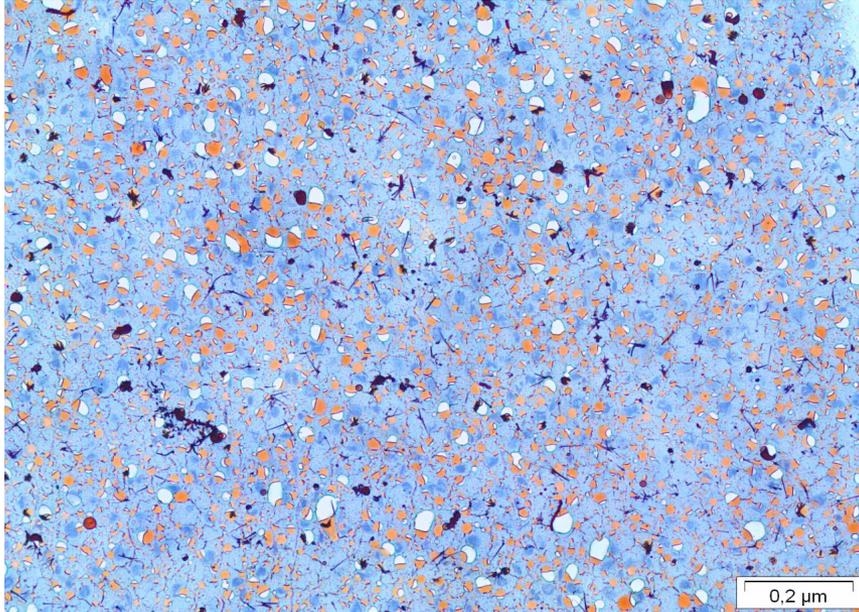
Realimentação com Sacarose ou Banha



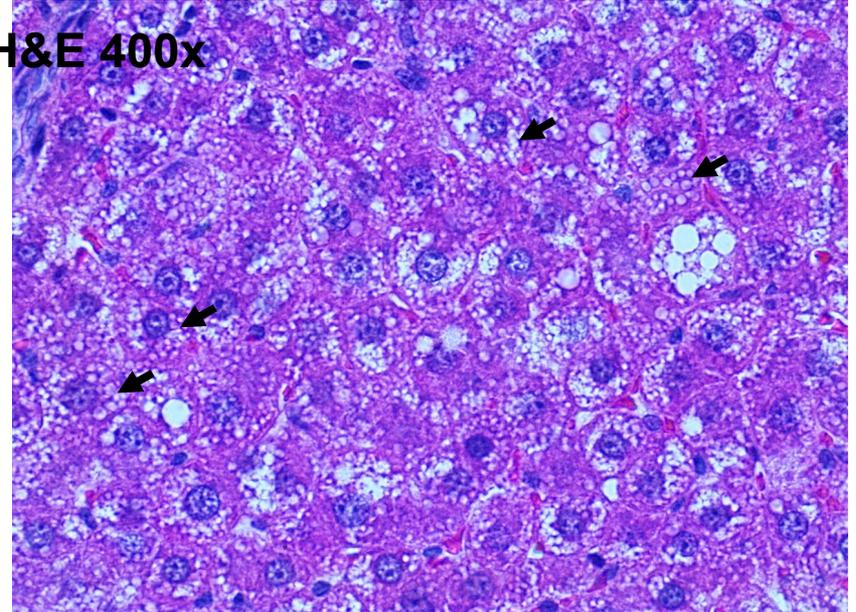
Sacarose:
Degeneração
baloniforme,
Acúmulo água
Depleção de
potássio,
magnésio e
fósforo

Hepatic Ballooning Degeneration: A new feature of the refeeding syndrome in rats. Canale, AF & Jordao AA. Artigo em redação.

Realimentação com Lipídios



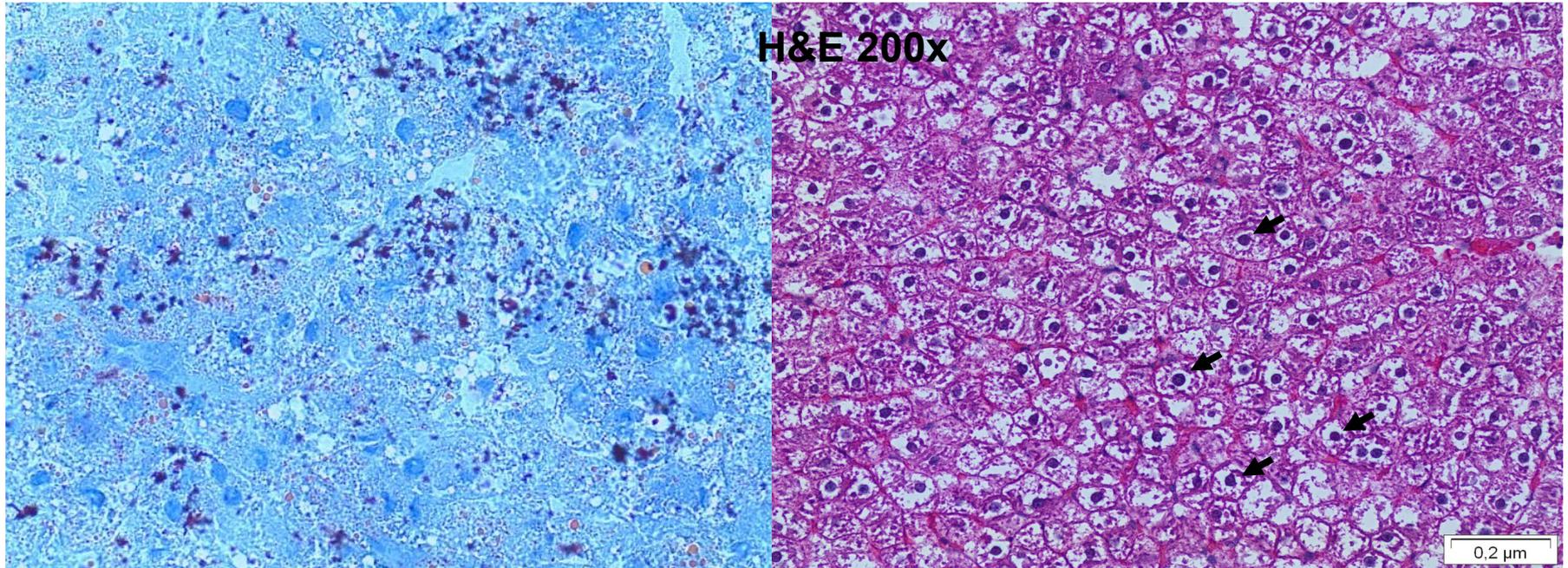
H&E 400x



Microfotografia Sudan com esteatose grau 3 e microfotografia H&E com esteatose microvesicular no tecido hepático, em animais realimentados com lipídio.

Hepatic Ballooning Degeneration: A new feature of the refeeding syndrome in rats. Canale, AF & Jordao AA. Dados não publicados

Realimentação com Sacarose



Microfotografia Sudan com esteatose leve e microfotografia H&E com degeneração baloniforme no tecido hepático, animais realimentados com carboidrato

Hepatic Ballooning Degeneration: A new feature of the refeeding syndrome in rats. Canale, AF & Jordao AA. Dados não publicados

Dieta: Realimentação com CHO e Lipídios

- Maior estresse oxidativo hepático somente na realimentação rica em lipídio: Depleção da vitamina E e GSH com aumento da peroxidação lipídica
- Realimentação com sacarose: sem alteração no estresse oxidativo mas com depleção de minerais e mudança na arquitetura hepática (degeneração baloniforme): Modelo similar a **Síndrome de Realimentação**

Dieta Isenta de Carboidratos

Dietas pobres ou praticamente isentas de carboidratos, similar a muitas dietas restritas da moda, de características cetogênicas, por exemplo dietas do tipo “Atkins”.

Poucos estudos com efeito na esteatose



Dieta Isenta de Carboidratos

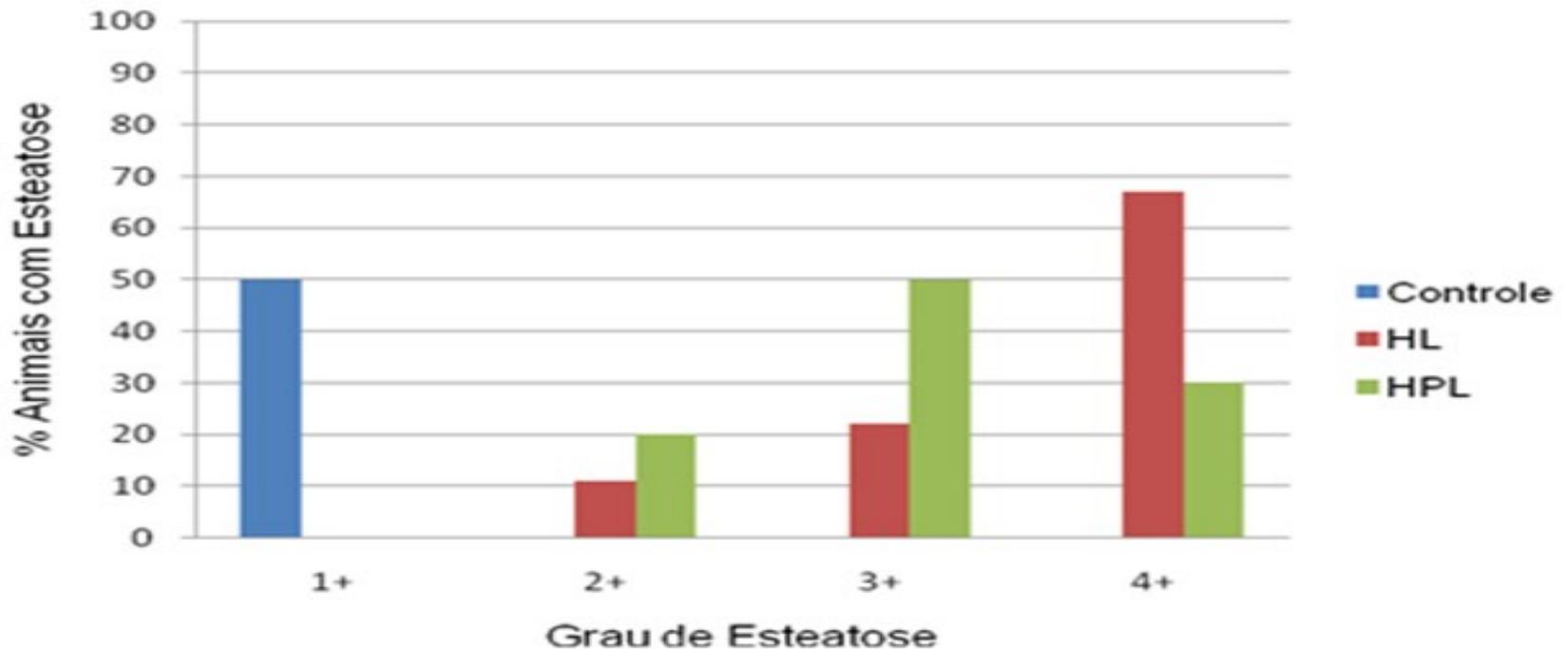
Dieta controle, hiperlipídica (50%) ou Isenta de Carboidratos (50% Lip + 40 Ptn), por 28 dias.

- **Dieta isenta de carboidratos levou a:**
- **Esteatose menos pronunciada (grau 3)**
- **Diminuição do colesterol hepáticos, aumento do sérico.**
- **Sem alterações no sistema antioxidante**
- **Artigo recente mostra níveis de colesterol de 0.44 para 5.6 mmol/l com dieta cetogênica em humanos, por 03 semanas.**
 - **Front. Physiol., 19/12/2019**

<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01499>

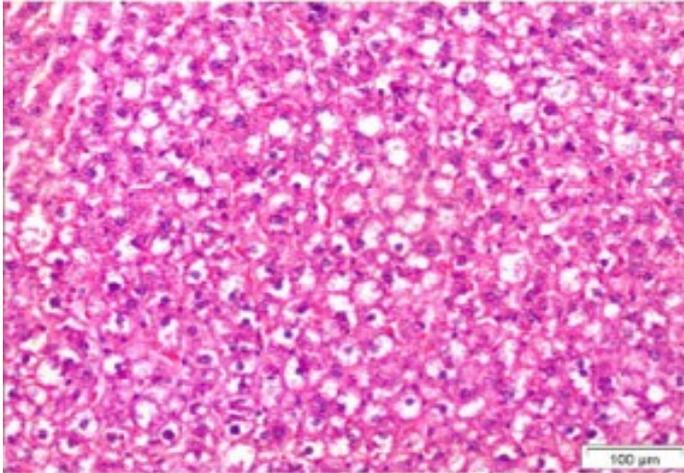
Leonardi DS et al. Metabolic Differences in the Steatosis Induced by a High-Fat Diet and High-Protein-Fat Diet in Rats
Advances in Biochemistry 2015; 3(6): 86-95

Dieta Isenta de Carboidratos

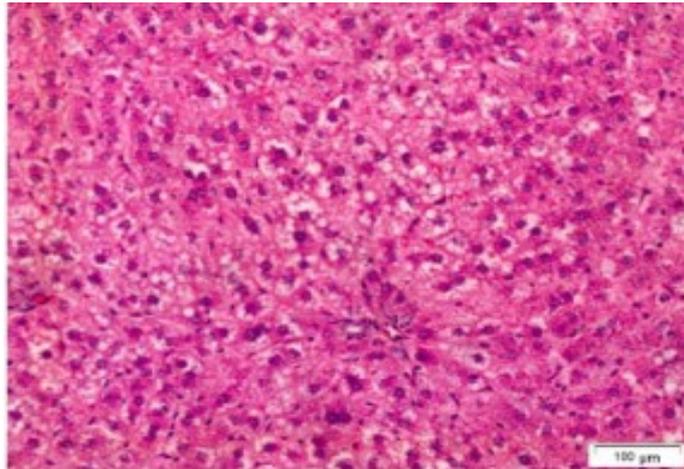


Porcentagem de animais com esteatose segundo avaliação histológica semi-quantitativa.

Dieta Isenta de Carboidratos



Grupo Hiperlipídico com esteatose predominantemente macrovesicular



Grupo sem Carboidratos com esteatose microvesicular: tipo de esteatose associada a piora da fibrose e a encefalopatia hepática



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

• Tópicos da aula:

- ❖ Esteatose hepática não alcoólica
 - ❖ Definições e Prevalência
 - ❖ Papel da Dieta e dos Radicais Livres
- ❖ Padronização da dieta
 - ❖ Métodos Laboratoriais utilizados
- ❖ Modificações na dieta: Lipídios e Carboidratos
- ❖ Modificações na dieta: Outros Nutrientes
- ❖ Conclusões e Perspectivas Futuras

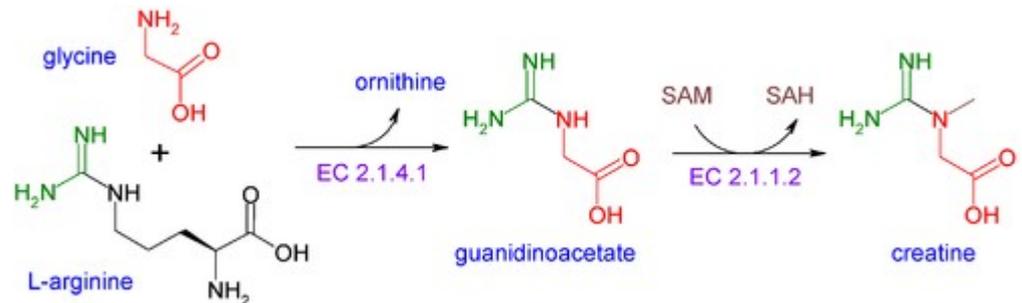


Alterações no teor de Nutrientes

Padronização do modelo de Esteatose via deficiência de Metionina e Colina

Papel da creatina como antioxidante

Papel da creatina na esteatose e seus efeitos na transferência de grupos metila e sulfidrilas



Dieta Deficiente em Colina e Metionina

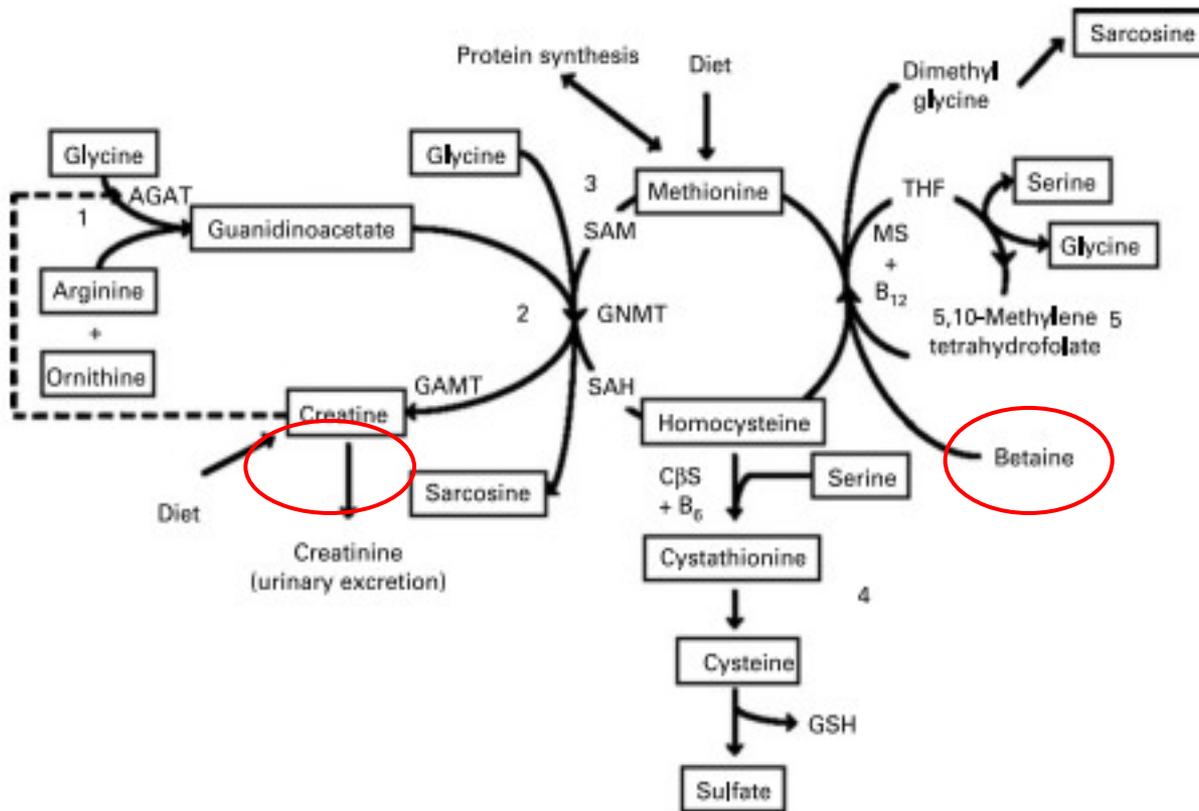
Deficiência de colina e metionina por dois meses:

- **Esteatose: Gordura hepática**
 - Controle 24 mg/g e DCM com 64 mg/g tecido
- **Maior dano oxidativo ao DNA**
- **Maior Peroxidação Lipídica**
- **Corpúsculos de Mallory e degeneração baloniforme**
- **Indicativo de esteatohepatite (NASH)**
- **Ciclo da Homocisteína....**

Jordao AA et al. Progression of lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid reactive substances, damage to DNA and histopathological changes in the liver of rats subjected to a methionine-choline-deficient diet. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009 Sep;105(3):150-5.

Creatina como antioxidante

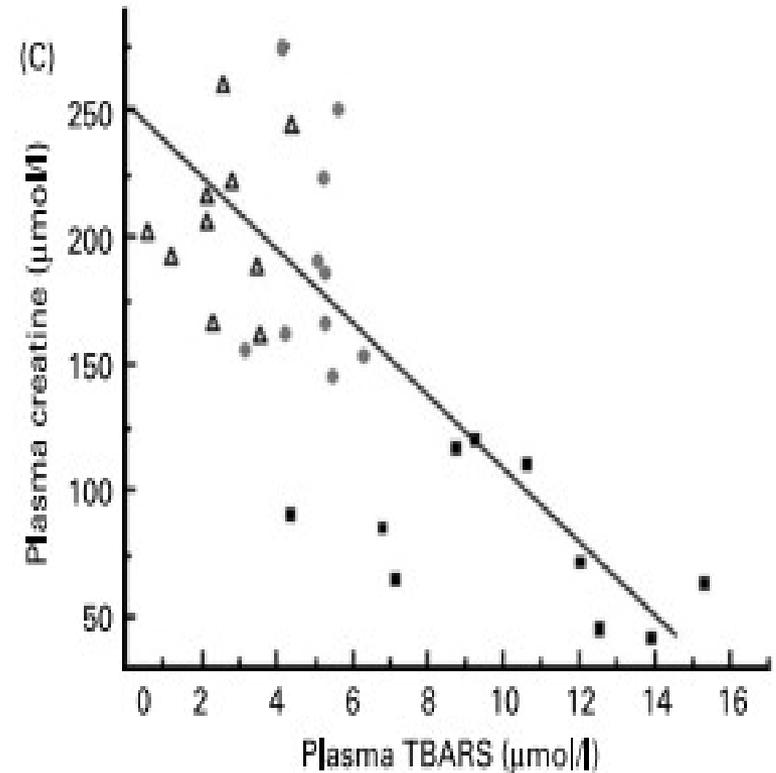
Creatine, homocysteine and lipid peroxidation



**Creatina
como potente
antioxidante
e regulando o
ciclo da
Homocisteína**

Creatina como antioxidante

- Um dos primeiros artigos que descreve papel protetor da creatina na esteatose
- Modulação positiva do colesterol, triglicerídeos, insulina e na glicemia.
- Melhora peroxidação lipídica



Deminice R, Portari GV, Vannucchi H, Jordao AA. Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. Br J Nutr. 2009 Jul;102(1):110-6.

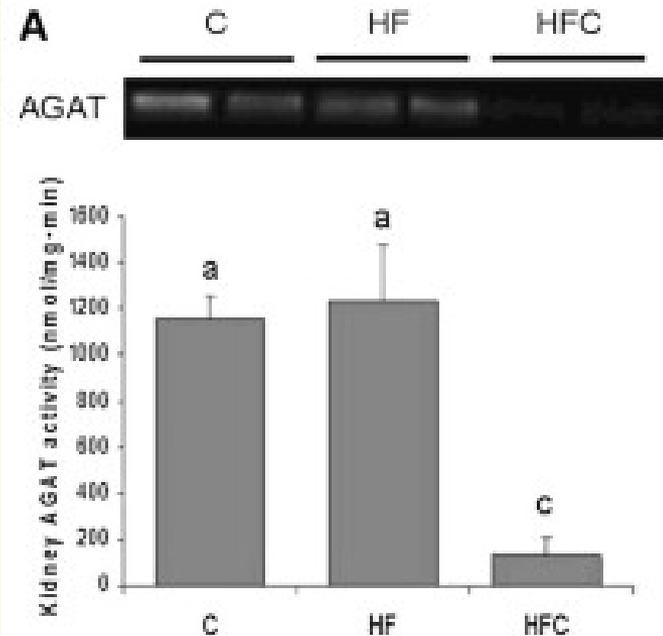
Creatina: Homocisteína e Esteatose

Suplementação com 2% de creatina, por 04 semanas:

- Menores níveis de gordura, triglicerídeos e colesterol hepático
 - Diminuição da Homocisteína.
 - Maior envolvimento da via betaína-Colina
- Alteração do fluxo metilação e transulfuração
- Modulação da expressão gênica (PPAR's).

Creatina na Dieta Hiperlipídica

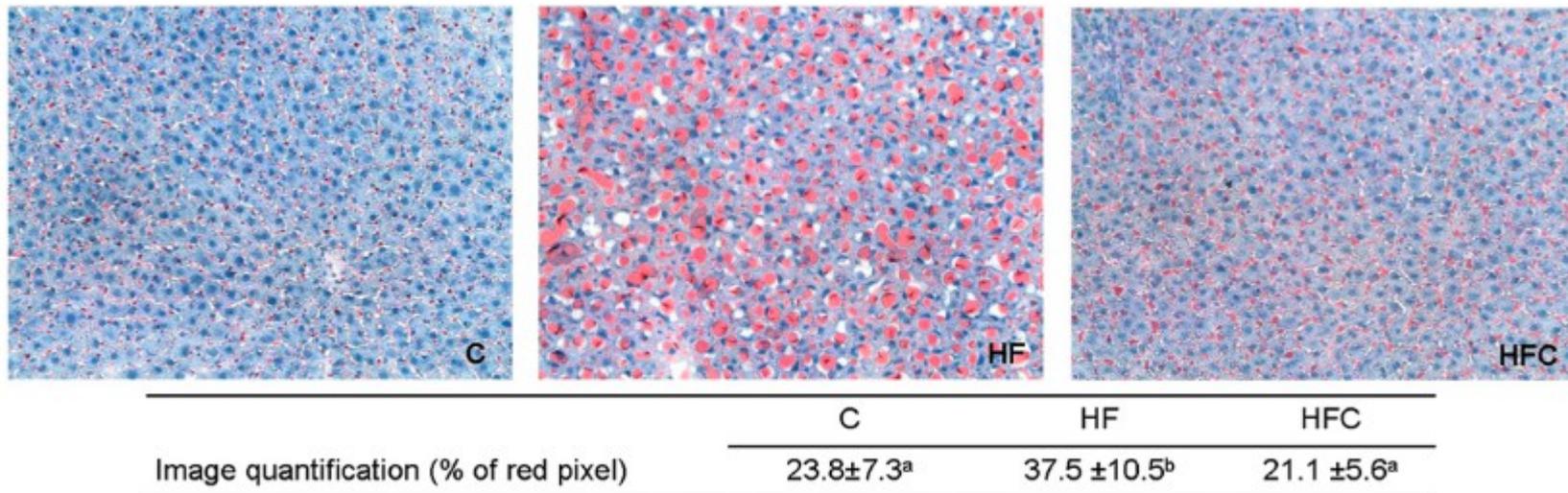
- **Uso da creatina no modelo de esteatose hepática induzida pela dieta hiperlipídica.**
- **Valores menores de gordura, triglicerídeos, colesterol, peroxidação lipídica, glicose e insulina, no grupo suplementado com creatina**



**Menor atividade AGAT
Redução da Homocisteína**

Deminice R et al. Creatine supplementation prevents the accumulation of fat in the livers of rats fed a high-fat diet. *J Nutr.* 2011 Oct;141(10):1799-804.

Creatina na Dieta Hiperlipídica



Redução da quantidade de gordura hepática com creatina (1%) por 3 semanas, mesmo com dieta Hiperlipídica.

Diets com antioxidantes

Evidências emergentes sugerem o uso de antioxidantes e alguns alimentos funcionais com propriedades terapêuticas para Esteatose Hepática, devido ao seu potencial de interferir nas vias de sinalização na patogênese da Esteatose, especialmente impedindo a inflamação.

Projeto atual laboratório: Efeitos hepáticos da ingestão de própolis verde com uma dieta hiperlipídica em camundongos

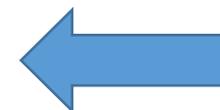


Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

• Tópicos da aula:

- ❖ Esteatose hepática não alcoólica
 - ❖ Definições e Prevalência
 - ❖ Papel da Dieta e dos Radicais Livres
- ❖ Padronização da dieta
 - ❖ Métodos Laboratoriais utilizados
- ❖ Modificações na dieta: Lipídios e Carboidratos
- ❖ Modificações na dieta: Outros Nutrientes
- ❖ Conclusões e Perspectivas Futuras





Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Padronização de uma série de modelos de esteatose hepática, utilizando dietas com alterações quantitativas e qualitativas nos seus nutrientes.

Importante destacar não só a caracterização do modelo animal mas indicativos de estudos de prevenção e/ou tratamento.



Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

- Modelos dietéticos agudos e crônicos de esteatose:
 - Modulação positiva com óleos de canola, peixe + soja e com Frutooligossacarídeos
 - Efeitos mistos com triglicerídeos de cadeia média
 - Efeitos negativos com óleo de coco, gordura vegetal hidrogenada e ácido linoleico conjugado
 - Síndrome da realimentação com sacarose
 - Creatina como antioxidante e efeitos no ciclo da Homocisteína e também com dieta hiperlipídica.

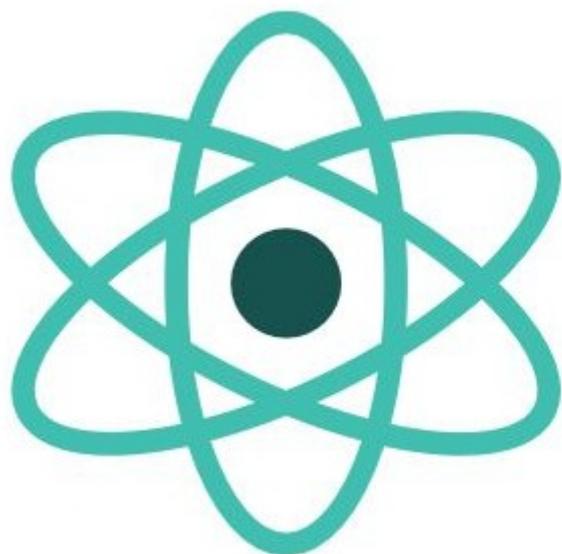


Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

O quadro de esteatose não pode mais ser visualizado como uma simples manifestação hepática da síndrome metabólica mas como de causa multifatorial e consequências sistêmicas.

Perspectivas futuras devem levar em conta a modulação da esteatose hepática na disfunção metabólica, conceito de Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease - MAFLD



LabRA

**Laboratório de Radicais
Livres e Antioxidantes
FMRP-USP**

Se tiverem dúvidas ou curiosidade em relação aos trabalhos
apresentados em aula podem me contatar:

aajordao@gmail.com

<https://www.instagram.com/labra.fmrp/>