

---

---

---

---

---

---

---

- 
- CONTENIDO**
- [1. Introducción](#)
  - [2. Métodos gráficos de alineamiento](#)
  - [3. Puntuación de los alineamientos](#)
  - [4. Algoritmos de alineamiento óptimo para pares de secuencias](#)
  - [5. Alineamientos múltiples](#)

---

---

---

---

---

---

---

**1. INTRODUCCIÓN**

---

---

---

---

---

---

---

## ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

- Es probablemente la Herramienta más utilizada en bioinformática
- Se comparan dos ("pairwise") o más ("multiple") secuencias para evidenciar las regiones que son similares y aquellas donde difieren.

...AGTAT-C...  
 ...AG-ATGC...

- Un alineamiento ÓPTIMO es aquel que exhibe la mayor cantidad de similitudes y las menores diferencias.

---

---

---

---

---

---

---

---

### INTERPRETACIÓN DE SIMILARIDAD BIOLÓGICA

**HOMOLOGÍA**

Proceso Evolutiva Divergente (mutaciones y selección)

Similitud

**SIMILARIDAD**

Las secuencias son similares sin tener connotaciones evolutivas

**ANALOGÍA**

Evolución Convergente

Similitud

From W. M. Fitch, 2000: "Homology: a personal view on some of the problems", Trends in genetics, 16, p227-231

---

---

---

---

---

---

---

---

### HOMOLOGÍAS

**ORTOLOGÍA**

Especiación

**HOMOLOGÍA:**

las secuencias están relacionadas evolutivamente y pueden provenir de un ancestro común.

**PARALOGÍA**

Duplicación Génica

**XENOLOGÍA**

Transferencia Lateral

---

---

---

---

---

---

---

---

La divergencia ocasiona que el parecido entre secuencias se aproxime asintóticamente al azar

- Al aumentar la divergencia se dificulta distinguir homólogos de no homólogos.
- Antes del **twilight zone** la homología apareada basta; después de allí puede ser imposible distinguir los homólogos.
- Las comparaciones de proteína conservan más información que las de ADN y pueden detectar homología más remota.

---

---

---

---

---

---

---

---

## VISIÓN GENERAL DE LOS MÉTODOS

- ALINEAMIENTO DE DOS SECUENCIAS
  - Métodos gráficos: **Dotplot**. Es intuitivo, pero difícil de cuantificar
  - Algoritmos óptimos de alineamiento global (NW) o local (SW)
    - Obtienen el mejor alineamiento posible con *programación dinámica*
    - Son demasiado exigentes para ser prácticos en búsquedas extensivas
- ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES
- ALGORITMOS HEURÍSTICOS PARA BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS **FASTA, BLAST**
  - Dan soluciones buenas, no necesariamente óptimas
  - Pueden ser mucho más rápidos

---

---

---

---

---

---

---

---

**Problema Biológico**  
Encontrar una forma de comparar y representar la similitud o diferencia entre secuencias (DNA, RNA o amino ácidos)

**Problema Computacional**  
Encontrar una forma de un apareamiento aproximado de subsecuencias dentro de cadenas de caracteres

---

---

---

---

---

---

---

---

## APLICACIONES

Los alineamientos permiten:

- Descubrimiento de relaciones estructurales, funcionales y evolutivas  
Secuencias similares → similar estructura y función proteica
- Identificación de patrones conservados
- Detección de duplicaciones en las secuencias
- Aproximación a mutaciones puntuales
- Estimación de distancia entre especies
- Planteamiento de hipótesis filogenéticas
- Inferencia de eventos evolutivos
- Búsqueda de secuencias en bases de datos

---

---

---

---

---

---

---

---

## 2. MÉTODOS GRÁFICOS DE ALINEAMIENTO

---

---

---

---

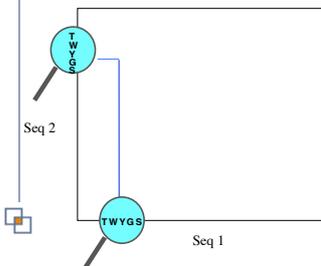
---

---

---

---

### Método de diagonales o DOT-PLOT



- Ofrece una comparación gráfica de las secuencias
- Busca evidenciar relaciones de similitud entre las dos secuencias
- Las líneas verticales y horizontales son gaps (inserciones-delecciones).

---

---

---

---

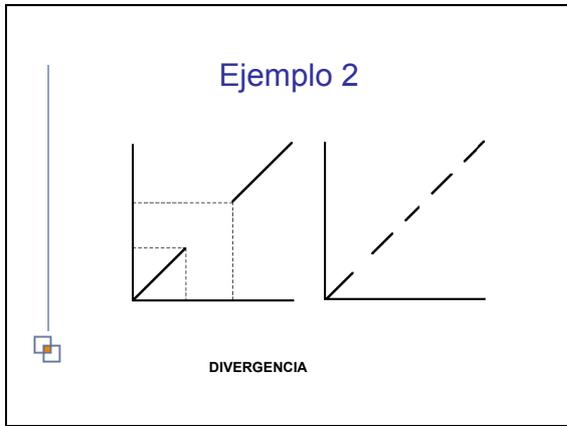
---

---

---

---





---

---

---

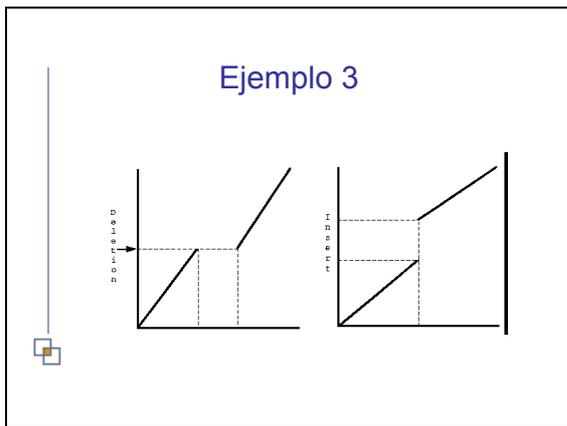
---

---

---

---

---



---

---

---

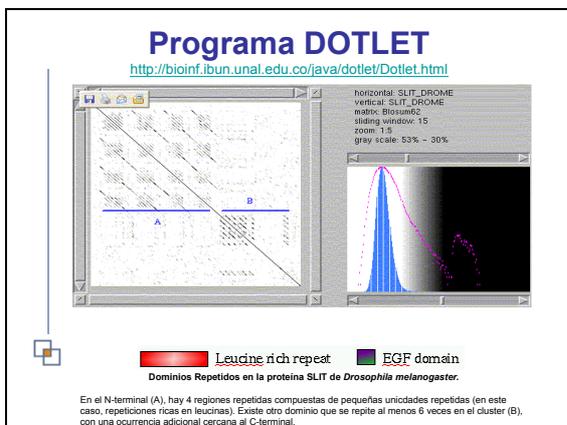
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

**Programa DOTLET**  
<http://bioinf.ibun.unal.edu.co/java/dotlet/Dotlet.html>

---

---

---

---

---

---

---

---

**3. PUNTUACIÓN DE LOS ALINEAMIENTOS**

---

---

---

---

---

---

---

---

**SISTEMAS DE PUNTUACIÓN**

- Deben definirse para poder cuantificar la *similitud* entre dos cadenas S y T.
- Así para cada alineamiento se calcula un número que, a mayor valor, represente la mayor significancia (biológica)
- Una vez definido el sistema a usar, la *puntuación (score)* de una pareja de caracteres s,t alineados se define como  $p(s,t)$

$$Score = \sum_{Vi} p(S[i],T[i])$$

- El sistema para puntuar los apareamiento entre AA debe reflejar su relación química y biológica

---

---

---

---

---

---

---

---

## SISTEMAS DE PUNTUACIÓN

- Pueden ser esquemas sencillos como por ejemplo:

- Apareamiento  $S[i]=T[i] \rightarrow 1$ ,
- No apareamiento,  $S[i] \neq T[i] \rightarrow 0$ ,
- Inserción de espacios (*gaps*)  $\rightarrow -2$

```

A - - - - T C G G T A T C - -
      |   |   |   |   |
A T T C G A T - G - A A T C G
T
1 -2 -2 -2 -2 -2 1 -2 1 -2 0 1 1 1 -2
-2 = -12
    
```

- O bien sistemas más complejos basados en afinidades químicas o en frecuencias observadas de apareamiento, como por ejemplo las *matrices de sustitución*

---

---

---

---

---

---

---

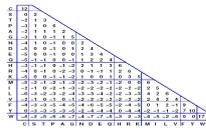
---

---

---

## MATRICES DE SUBSTITUCIÓN

Contienen valores proporcionales a la probabilidad de que un aminoácido "i" sea sustituido por un aminoácido "j", calculados para todos los pares de aminoácidos posibles.



El término "sustitución" indica que el objetivo de puntuar un apareamiento es valorar el coste evolutivo y funcional de cambiar un residuo por otro

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## CLASES...

- No hay una matriz única que se pueda usar siempre
- Se utilizan según la familia de proteínas y el grado de similitud esperado
- Las más utilizadas
  - **PAM: Percent Accepted Mutation Matrix**
    - Derivadas de alineamientos globales de secuencias cercanamente relacionadas.
    - PAM40  $\rightarrow$  PAM250. A mayor N° mayor distancia evolutiva
  - **BLOSUM**
    - Derivadas de alineamientos locales de secuencias distantes
    - BLOSUM90  $\rightarrow$  BLOSUM45 El N° representa porcentaje de identidad

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### PAM (Número de mutaciones aceptadas por 100 nucleótidos)

- PAM, Dayhoff, MDM (Mutation Data Matrix).
- Dayhoff Generó árboles filogenéticos hipotéticos "reales" y relacionó cada secuencia con su ancestro inmediato, determinando frecuencias de pares de aa (Mutaciones)
- Indicada para realizar alineamientos de secuencias con ancestros comunes.
- Permite relacionar familias de proteínas por su distancia evolutiva.

---

---

---

---

---

---

---

---

**PAM 2 PAM 1**  
**UNIDADES EVOLUTIVAS**

PAM 1, PAM 2, PAM 40, PAM 120, PAM 250  
A mayor Número = Mayor distancia evolutiva

---

---

---

---

---

---

---

---

Al comparar dos secuencias, se debe determinar la frecuencia de cada una de las mutaciones aceptadas entre residuos.

secuencias                      matriz de frecuencias

ABCAABC                      

	A	B	C
A		$f_{AB}$	$f_{AC}$
B	$f_{BA}$		$f_{BC}$
C	$f_{CA}$	$f_{CB}$	

AABCACC

---

---

---

---

---

---

---

---

Número total o frecuencia total de mutaciones de cada residuo

Numero total de mutaciones

$$f_A = \sum(f_{AB,BA,CA,AC})$$

$$f_B = \sum(f_{AB,BA,CB,BC})$$

$$F = \sum(f_A, f_B, f_C, \dots)$$

PAM K = PAM 40, PAM 120 ...

PAM K  $\rightarrow S_{AB} = \text{Log} [(M_{AB})^K / p_B]$

---

---

---

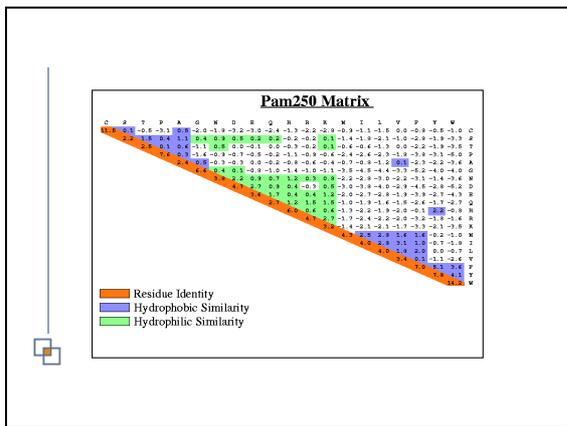
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

### BLOSUM (matriz de sustitución de bloques)

- Steve Henikoff (1992)
- Los valores están basados en la observación de frecuencias de sustitución en bloques de ALINEAMIENTOS LOCALES de proteínas relacionadas

```

AAACDA..BBQDA
DABQDA..A..BBQBB
BBQDAABA..BCCBA
AAACDAA..DCBQDB
CCBADAB..DBBQCC
AAACAA....BBQCC
    
```

← BLOQUES: fragmentos o regiones conservadas de un grupo de secuencias.

- Indicada para identificar secuencias desconocidas.
- Calcula frecuencias de apareamientos y luego matriz de sustitución.

---

---

---

---

---

---

---

---

### BLOSUM 62

	A	C	D	E	F	G	H
A	4	0	-2	-1	-2	0	-2
C	0	9	-3	-4	-2	-3	-3
D	-2	-3	6	2	-3	-1	-1
E	-1	-4	2	5	-3	-2	0
F	-2	-2	-3	-3	6	-3	-1
G	0	-3	-1	-2	-3	4	-2
H	-2	-3	-1	0	-3	-2	3

BLOSUM 62

El número hace referencia al mínimo porcentaje de homología de los bloques usados para construir la Matriz.

BLOSUM 62 fue calculada a partir de la comparación de secuencias con una divergencia mínima de 62%

BLOSUM62 Substitution Scoring Matrix - The BLOSUM 62 matrix shown here is a 20 x 20 matrix of which a section is shown here in which every possible identity and substitution is assigned a score based on the observed frequencies of such occurrences in alignments of related proteins. Identities are assigned the most positive scores. Frequently observed substitutions also receive positive scores and seldom observed substitutions are given negative scores.

---

---

---

---

---

---

---

---

PAM	BLOSUM
Calculada a partir de alineamientos globales	Calculada a partir de alineamientos locales
Secuencias de proteínas usadas en alineamiento tienen >99% de identidad	Puede seleccionar un nivel de similitud entre las secuencias usadas en el análisis
Las matrices son extrapolaciones matemáticas de la matriz PAM1	Cada matriz es el resultado del análisis de un alineamiento de bloques conservados (análisis real)
Es posible montar un modelo evolutivo y así generar nuevas matrices a partir de la primera	No permite generar un modelo evolutivo
	Permiten detectar las mejores secuencias con relación biológica

BLOSUM 80 PAM 1	BLOSUM 62 PAM 120	BLOSUM 45 PAM 250
<b>MEJORES DIVERGENTE</b>	<	>
		<b>MEJORES DIVERGENTE</b>

---

---

---

---

---

---

---

---

### PENALIZACIÓN POR "GAPS"

- En un sistema de puntuación es importante definir el coste de insertar o eliminar un residuo, lo que en el alineamiento aparece como un hueco ("gap")
- Suele penalizarse diferente
  - el primer hueco ("gap opening")
  - que los restantes ("gap extension") que parten de él
- La variación de estos parámetros puede tener efectos importantes en el alineamiento final

---

---

---

---

---

---

---

---

### “Gaps” EN EL INICIO DEL ALINEAMIENTO

Si el dot-plot tiene este aspecto

El alineamiento es:

```

A T C G A
- - | | |
  C G A
            
```

Si el dot-plot tiene este aspecto

El alineamiento es:

```

- - G C T
T A | | |
  G C T
            
```

---

---

---

---

---

---

---

---

### EFECTO DEL VALOR DE LA PENALIZACIÓN

Costo de apertura de <i>gap</i>	Costo de extensión del <i>gap</i>	Comentario
Grande	Grande	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pocas inserciones o eliminaciones</li> <li>• Adecuado para proteínas muy relacionadas</li> </ul>
Grande	Pequeño	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Algunas inserciones grandes</li> <li>• Adecuado si hay la posibilidad que se hayan insertado dominios completos</li> </ul>
Pequeño	Grande	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muchas inserciones pequeñas</li> <li>• Adecuado si se trata de proteínas distantes</li> </ul>

---

---

---

---

---

---

---

---

## 4. ALGORITMOS DE ALINEAMIENTO

---

---

---

---

---

---

---

---

### ALGORITMO EXHAUSTIVO...

- Un algoritmo para obtener el alineamiento óptimo consiste de:
  - Construir todos los posibles alineamientos
  - Calcular la puntuación de cada uno
  - El alineamiento óptimo es el que obtenga el MAYOR valor (puede haber más de uno!)
- El número de alineamientos posibles es muy alto:

Si S, T constan de unos 20 caracteres pueden NECESITARSE más de  $2^{40}$  operaciones!!!

---

---

---

---

---

---

---

---

### UNA ALTERNATIVA...

La PROGRAMACIÓN DINÁMICA (PD) es una técnica de diseño de algoritmos que evita evaluar todas las trayectorias

- La idea es plantear la solución de un problema en términos de un caso mas sencillo, y este en términos de otro mas sencillo, y así sucesivamente...(recursivamente)
- En el caso de un alineamiento, el problema para dos secuencias se puede plantear recursivamente en términos de subsecuencias de menor tamaño cada vez.
- El problema se resuelve en  $N \times M$  cálculos.

---

---

---

---

---

---

---

---

### ALGORITMOS DE ALINEAMIENTO CON PD

- Los dos más conocidos son
  - Needleman y Wunsch (1970) para alineamientos globales
  - Smith y Waterman (1981), una variante para alineamientos locales
- Sirven para alinear tanto ADN como proteínas
- Cada algoritmo produce los alineamientos con la máxima puntuación posible para una matriz de sustitución y un coste de "gaps" dados
- El alineamiento obtenido no tiene necesariamente un significado biológico

---

---

---

---

---

---

---

---

### ALINEAMIENTO GLOBAL Algoritmo de Needleman & Wunsch

- Similitud considerada en toda la longitud de la secuencia
- Permite:
  - Identificar repeticiones *intraespecies* (G1 vs G1) o
  - Encontrar secuencias conservadas *entre especies* (G1 vs G2)
- Ejemplo: Genes ribosomales rRNA 16S de Organismo "A" x 1 registro en base de datos

---

---

---

---

---

---

---

---

### ALINEAMIENTO GLOBAL POR PD

- Se llena la matriz de puntuaciones (Score Matrix),  $P$ , de arriba abajo y de izquierda a derecha mediante el siguiente algoritmo:
  - $P(0,0)=0; P(0,k)=-W_k; P(k,0)=-W_k$
- $P(i,j) = \max \begin{cases} P(i-1,j-1) + S(i,j), & \text{celda anterior en diagonal} \\ \max_{x \geq 1} \{P(i-x,j) - W_x\}, & \text{celdas anteriores de la fila} \\ \max_{y \geq 1} \{P(i,j-y) - W_y\}, & \text{celdas anteriores de la columna} \end{cases}$
- $S(i,j)$ : Puntuación para coincidencia o no
- $W_k = a+b \cdot k$ : Penalización afin para agujero de medida  $k$

---

---

---

---

---

---

---

---

### Matriz de reconstrucción (Traceback)

- Para reconstruir el alineamiento, al mismo tiempo que se llena la matriz de puntuaciones, se llena la matriz de reconstrucción,  $T$ , de la siguiente forma:
  - $T(i,j)=0$ , si el máximo viene de la diagonal
  - $T(i,j)=+y$ , si el máximo viene de un desplazamiento vertical de  $y$  celdas
  - $T(i,j)=-x$ , si el máximo viene de un desplazamiento horizontal de  $x$  celdas
- Si hay empate anotamos todos los valores iguales

---

---

---

---

---

---

---

---

## Reconstrucción del alineamiento

- Para reconstruir el alineamiento se busca, en la *matriz de puntuaciones*, la celda de la última fila o columna con la puntuación más grande
- Se escoge la misma celda en la *matriz de reconstrucción* y se va retrocediendo según los valores indicados en ésta
- Este procedimiento puede dar más de un alineamiento óptimo

---

---

---

---

---

---

---

---

## EN RESUMEN...

Score óptimo = 2

Alineamientos:

A B D D E F	A B D D E F
G H I	G H I
A B D - E G	A B - D E G
K H I	K H I

[S.A. Needleman and C.D. Wunsch \(1970, J. Mol. Biol. 48:443\).](#)

---

---

---

---

---

---

---

---

## PROGRAMAS EN LA WEB...

→ Compare	<b>EMBOSS</b>	→ Needle
→ Dotplot		→ Stretcher
→ Align		→ est2genome
→ Needle		→ Alignwrap
→ GAP		
→ Bestfit		
→ Framealign		
→ Plotsimilarity		

---

---

---

---

---

---

---

---

## ALINEAMIENTO LOCAL

### Algoritmo de Smith - Waterman

- Las regiones de similitud se presentan en solo una parte de la extensión de la secuencia
- Permite:
  - Detectar dominios homólogos incluidos dentro de proteínas no homólogas.
  - Encontrar exones en una secuencia genómica de ADN al alinearla con sus secuencia de ARNm.

---

---

---

---

---

---

---

---

Busca las regiones de *similitud* entre dos secuencias, reportando el *alineamiento local* con el *máximo puntaje*

- Desarrollado como modificación al algoritmo de Needleman - Wunsch, ya que se reconoció que la mayoría de regiones con significancia biológica en secuencias de ADN y Proteína eran subregiones cortas y muy similares no detectadas en el alineamiento global.

Además, que las inserciones o deleciones de cualquier tamaño, son probablemente encontradas como cambios evolutivos en las secuencias, por lo tanto en su método les asignaron un peso ("Deletion weights").

Para predecir la función de una proteína desconocida suelen buscarse *dominios funcionales* comunes, mediante *alineamientos locales* entre dos secuencias mediante *alineamientos múltiples* entre conjuntos de secuencias

---

---

---

---

---

---

---

---

## ALINEAMIENTO LOCAL POR PD

$$-P(i,j) = \max \begin{cases} P(i-1,j) + S(i,j), \\ \max_{\text{del}} \{P(i-1,j) - W_d\}, \\ \max_{\text{ins}} \{P(i,j-1) - W_i\}, \\ 0 \end{cases}$$

Si el mejor alineamiento hasta un cierto punto tiene un valor negativo es mejor empezar uno nuevo en lugar de extender el viejo.

**Matriz de puntuaciones:**  
No se penalizan los gaps de las bandas derecha e izquierda

0	0	0	0	0	0	..
0						
0						
0						
..						

P[i,0] = 0 ; per i= 0...m  
a[0,j] = 0 ; per j= 0...n

---

---

---

---

---

---

---

---

### PROGRAMACIÓN DINÁMICA

	0	G	A	W	G	H	E	E
0								
A								
W								
H								
E								
A								
E								

Secuencia 1: GAWGHEE  
Secuencia 2: AWHEAE

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0							
W	0							
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

f(0,1)	f(0,1)
f(0,1)	f(0,1)

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0						
W	0							
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i-1, j-1) + s(x_i, y_j)$   
 $(0) + (0) = 0$

f(0,1)	f(0,1)
f(0,1)	f(0,1)

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0						
W	0							
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i-1, j) - d$   
 $(0) - 8 = -8$

$F(0, j)$	$F(0, j-1)$
$F(0, j)$	$F(0, j)$

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0						
W	0							
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i, j-1) - d$   
 $(0) - 8 = -8$

$F(0, j)$	$F(0, j-1)$
$F(0, j)$	$F(0, j)$

---

---

---

---

---

---

---

---

Parte de la Matriz de "Traceback"

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0						
W	0							
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i, j) = 0$

$F(0, j)$	$F(0, j-1)$
$F(0, j)$	$F(0, j)$

---

---

---

---

---

---

---

---

Parte de la Matriz de "Traceback"

	0	G	A	W	G	H	E	E
0								
A								
W								
H								
E								
A								
E								

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0						
W	0	0						
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	4	0				
W	0	0	0					
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i-1, j-1) + s(x_i, y_j)$   
 $(4) + (11) = 15$

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
D	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	4	0				
W	0	0	0	0				
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i-1, j) - d$   
 $(0) - 8 = -8$

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
D	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	4	0				
W	0	0	0	0				
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i, j-1) - d$   
 $(0) - 8 = -8$

---

---

---

---

---

---

---

---

	0	G	A	W	G	H	E	E
D	0	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	4	0				
W	0	0	0	15				
H	0							
E	0							
A	0							
E	0							

$F(i, j) = 15$

---

---

---

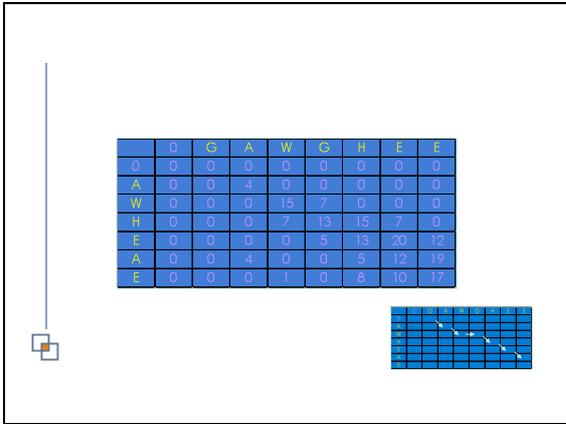
---

---

---

---

---




---

---

---

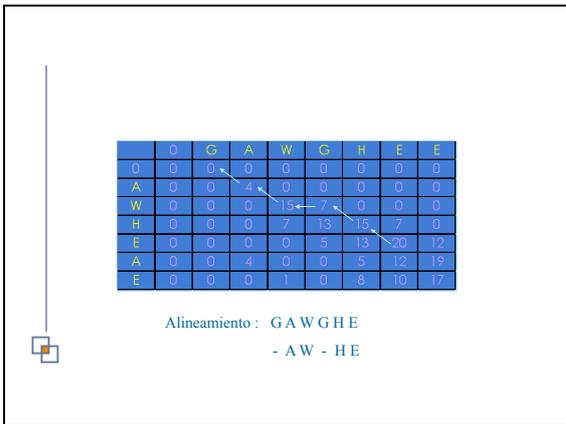
---

---

---

---

---




---

---

---

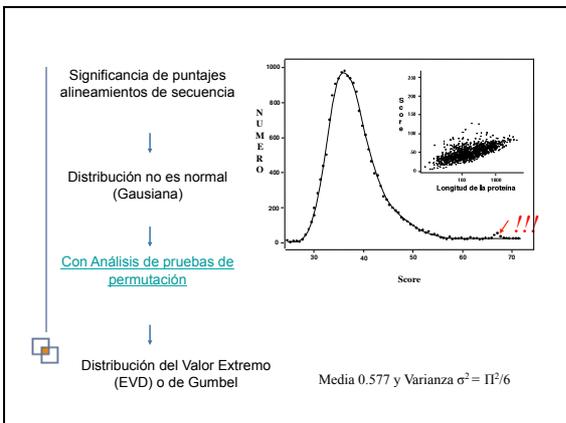
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

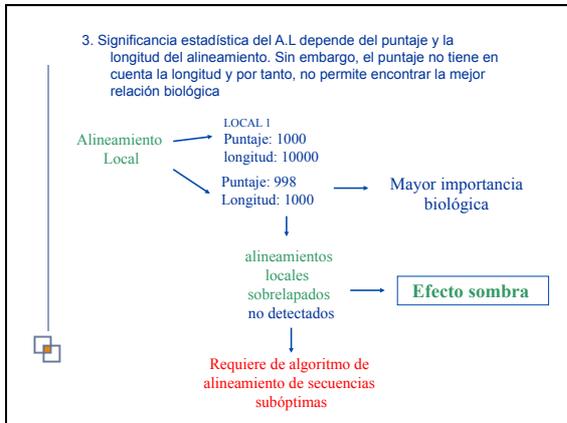
---

---

---








---

---

---

---

---

---

---

---

Posible "solución" :

**Algoritmo de Alineamiento Normalizado de Secuencias**

- Produce un alineamiento local con máximo grado de similaridad, eliminando efecto mosaico y de sombra.
- Reflejar la longitud del alineamiento local en el puntaje, puntaje  $F(i,j)$  / longitud total de regiones alineadas.
- Complejidad es  $O(n^2 \log_n)$ , sólo 3 a 5 veces mas lento que el algoritmo S-W estándar.
- Problema: Aún no están bien determinadas las reglas para la escogencia óptima de parámetro L.

Arslan et al, 2001(3)

---

---

---

---

---

---

---

---

## CUANDO REALIZAR UN ALINEAMIENTO LOCAL ?

- Si se conoce que dos secuencias son similares en alguna parte a través de su longitud, un alineamiento local es preferible que uno global.
- A veces los dos métodos proveen similares resultados, pero si la homología es distante, el A.L tiene mayor probabilidad de encontrar las zonas aún similares.
- Cuando las secuencias difieren en su longitud
- Favorece la búsqueda de patrones conservados de nucleótidos en secuencias de DNA o patrones de aminoácidos en secuencias de proteínas.
- Para alinear secuencias que comparten una región conservada o dominio.

---

---

---

---

---

---

---

---

### PROGRAMAS

**EMBOSS**

- **water** Alineamiento Local Smith-Waterman
- **matcher** Encuentra mejor A.L, es menos riguroso pero más rápido y reporta un # específico de alineamientos A.L. de una gran secuencia contra una o mas secuencias, es aún menos riguroso
- **supermatcher**
- **wordmatch** Encuentran los apareamientos entre secuencias utilizando tamaño de palabra
- **seqmatchall**

**GCG**

- **Besfit** Alineamiento Local Smith-Waterman

---

---

---

---

---

---

---

---

### CUÁL ES EL MEJOR ALINEAMIENTO?

- Intuición, conocimiento y experiencia, pero cómo probar?

---

---

---

---

---

---

---

---