

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Validación *in silico* de iniciadores para la
amplificación de genes de las familias de
citocromo P450 CYP6 y CYP9 en
Anopheles albimanus

Paola Mariana Ramírez Sazo

Guatemala
2009

Validación *in silico* de iniciadores para la
amplificación de genes de las familias de
citocromo P450 CYP6 y CYP9 en
Anopheles albimanus

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Validación *in silico* de iniciadores para la
amplificación de genes de las familias de
citocromo P450 CYP6 y CYP9 en
Anopheles albimanus

Trabajo de graduación presentador por
Paola Mariana Ramírez Sazo
para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala

Vo. Bo. :

(f) Mónica Stein C.
(Dra. Mónica Stein)

Tribunal Examinador:

(f) Mónica Stein C.
(Dra. Mónica Stein)

(f) Pamela Pennington
(Dra. Pamela Pennington)

(f) Norma Padilla
(Dra. Norma Padilla)

Fecha de aprobación: Guatemala, 25 de Mayo del 2009

PREFACIO

La resistencia a insecticidas es la capacidad de los insectos de tolerar dosis de insecticidas que pueden ser letales para la mayoría de individuos de una misma especie. Entre los mecanismos de resistencia están las enzimas detoxificadoras citocromo P450. Este trabajo tuvo como finalidad validar *in silico* iniciadores degenerados y específicos para amplificar genes citocromo P405 de la familia CYP6 y CYP9 en *Anopheles albimanus*

Una de las formas de control del mosquito vector de la malaria, es el uso de insecticidas. Debido al uso de insecticidas, es importante conocer los mecanismos que confieren esta resistencia como las enzimas citocromo P450. El principal vector de la malaria en Guatemala es *Anopheles albimanus*. No se cuenta aún con el genoma secuenciado de este vector por lo que tampoco se conoce la secuencia de los genes citocromo P450. Por esto es importante validar iniciadores que permitan amplificar estos genes y poder conocer su secuencia, para determinar en investigaciones futuras el papel que juegan estos genes citocromo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que citaré por su ayuda ya que sin ésta no hubiese sido posible este logro.

A Dios por estar conmigo y ayudarme en todo momento.

A mis padres René y Marina por su ayuda, amor y apoyo incondicional. A mi hermano José René por su cariño y apoyo.

A la Doctora Mónica Stein por su asesoría, dirección, apoyo y disponibilidad. También por la estimulación que me permitió crecer en conocimiento.

A la Doctora Norma Padilla, por ayudarme a desarrollar pensamiento crítico y guiarme en mis primeros pasos en la investigación.

A la Doctora Pamela Pennington, por motivarme y guiarme durante toda la investigación. Así como por su ayuda incondicional como Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología.

A la Licenciada Renata de Cabrera, por su guía y paciencia durante la investigación.

A mis amigos y compañeros de la carrera que me motivaron, acompañaron y que compartieron conmigo todos los momentos fáciles y difíciles de la carrera.

A todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación.

CONTENIDO

	Páginas
PREFACIO	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
LISTA DE CUADROS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxi
SINOPSIS	xxiii
ABSTRACT.....	xxv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
A. Malaria.....	3
1. Malaria en Guatemala.....	5
B. Descripción de <i>Anopheles</i>	5
1. Ciclo de vida	6
C. Filogenética de Anofelinos	9
D. Control de vectores	14
1. Insecticide-treated bed nets (ITN).....	14
2. Aplicación de insecticida en interiores (Indoor residual spraying).....	14
3. Reducción de fuentes de larvas (source reduction for larval control).....	15
4. Otros métodos: estos métodos incluyen el rociado de áreas extensas	15
E. Resistencia a insecticidas.....	16
F. Factores que influyen en la resistencia a insecticidas	17
1. Genéticos	17
2. Reproductivos	17
3. De comportamiento/Ecológicos.....	17
4. Operacionales	17
G. Mecanismos de resistencia	18
1. Resistencia por comportamiento.....	18
2. Resistencia de penetración.....	18
3. Resistencia metabólica.....	18
4. Resistencia por alteración del sitio blanco.....	18
H. Tipos de insecticidas utilizados para el control de la malaria.....	19
1. Organoclorados.....	19
2. Organofosfatados.....	19
3. Carbamatos	19

4.	Piretroides	19
I.	Resistencia a insecticidas en <i>Anopheles albimanus</i>	20
J.	Monooxigenasas Citocromo P450.....	21
1.	Mecanismo enzimático Mecanismo enzimático	21
2.	Características estructurales.....	21
K.	Resistencia por medio del citocromo P450.....	23
1.	Mecanismos moleculares de resistencia por medio de citocromo P450.....	24
L.	Citocromos P450 implicados en resistencia en Anofelinos	25
M.	Citocromos P450 implicados en resistencia en diferentes insectos	26
N.	Bioinformática	26
O.	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).....	27
1.	Estadística de los programas de bioinformática BLAST	27
P.	ClustalW	29
1.	Estadística de los programas de bioinformática ClustalW.	29
III.	JUSTIFICACIÓN	33
IV.	OBJETIVOS	35
A.	General.....	35
B.	Específicos.....	35
V.	MÉTODOS	37
A.	Procedimiento	37
1.	Búsqueda de secuencias.....	39
2.	Identificación de iniciadores a validar	41
3.	Alineamiento de secuencias.....	42
4.	Análisis de los iniciadores	44
5.	Análisis de datos	44
VI.	RESULTADOS	47
A.	Resultados del análisis de los iniciadores degenerados	47
1.	Análisis en ClustalW de iniciadores degenerados	47
2.	Análisis en OligoAnalyzer de iniciadores degenerados.....	63
B.	Resultados del análisis de los iniciadores específicos	66
1.	Análisis en BLAST de iniciadores específicos.....	66
2.	Análisis en ClustalW de iniciadores CYP6P3 y CYP6AA4.....	69
3.	Análisis en OligoAnalyzer de iniciadores específicos.....	71
VII.	DISCUSIÓN	79
VIII.	CONCLUSIONES.....	85
IX.	RECOMENDACIONES.....	87

X. LITERATURA CITADA	89
Referencias de Internet.....	93
XI. ANEXOS	97
Glosario.....	155

LISTA DE CUADROS

Cuadros	Página
Cuadro 1. Insecticidas utilizados en Guatemala para el control de la malaria. 1995-2005 (Zaim et al., 2007).....	20
Cuadro 2. Clasificación de los aminoácidos por sus características químicas (EMBL-EB 2009).	31
Cuadro 3. Secuencias de proteínas obtenidas de NCBI	40
Cuadro 4. Secuencias de proteínas obtenidas de NCBI	41
Cuadro 5. Iniciadores generales para las familias CYP6 y CYP9 (Amenya, <i>et.al.</i> 2005).	42
Cuadro 6. Iniciadores específicos (Wondji 2009) (Muller, <i>et.al.</i> 2008)	42
Cuadro 7. Parámetros a utilizar en BLAST en los alineamientos.....	43
Cuadro 8. Parámetros del alineamiento para ClustalW en los alineamientos	43
Cuadro 9. Parámetros para el análisis de los iniciadores en SciTools	44
Cuadro 10. Secuencias de proteínas de la familia CYP6 de insectos utilizados para el alineamiento de la Figura 14.....	47
Cuadro 11. Secuencias de proteínas de la familia CYP6 utilizadas para el alineamiento de la Figura 15	49
Cuadro 12. Secuencias de proteínas de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 16	50
Cuadro 13. Secuencias de proteínas de la familia CYP9 utilizadas en el alineamiento de la Figura 17	52
Cuadro 14. Secuencias de mARN de la familia CYP6 utilizados para el alineamiento de la Figura 18	53
Cuadro 15. Secuencias de mARN de la familia CYP6 utilizadas para el alineamiento de la Figura 19	55
Cuadro 16. Secuencias de mARN de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 20	56
Cuadro 17. Secuencias de mARN de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 21	58
Cuadro 18. Secuencias de mARN de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 23	59

Cuadro 19. Comparación de las diferentes regiones de las secuencias de insectos donde se unen los dos iniciadores reverse de la CYP9.....	60
Cuadro 20. Secuencias de proteínas de la familia CYP6 y CYP9 de <i>Anopheles</i> utilizados para el alineamiento de la Figura 23	61
Cuadro 21. Resultados del análisis del iniciador CYP6 en Oligo Analyzer	63
Cuadro 22. Resultados del análisis del iniciador CYP6 para estructuras de Hairpin.....	63
Cuadro 23. Resultados del análisis del iniciador CYP6 para formación de homodímeros y heteodímeros	63
Cuadro 24. Resultados del análisis del iniciador CYP9 en Oligo Analyzer	64
Cuadro 25. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para estructuras de Hairpin.....	64
Cuadro 26. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para formación de homodímeros y heteodímeros	64
Cuadro 27. Resultados del análisis del iniciador CYP9 en Oligo Analyzer	65
Cuadro 28. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para estructuras de Hairpin.....	65
Cuadro 29. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para formación de homodímeros y heteodímeros	65
Cuadro 30. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P9 con secuencias de Anofelinos.....	66
Cuadro 31. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P4 con secuencias de Anofelinos.....	66
Cuadro 32. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6AA4 con secuencias de Anofelinos.....	67
Cuadro 33. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P3 con secuencias de Anofelinos.....	67
Cuadro 34. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P1 con secuencias de Anofelinos.....	68
Cuadro 35. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P1 con secuencias de Anofelinos.....	68
Cuadro 36. Secuencias de mRNA de la familia CYP6 utilizados para el alineamiento de la Figura 25	69
Cuadro 37. Resultados del análisis del iniciador CYP6P9 en Oligo Analyzer	71
Cuadro 38. Resultados del análisis del iniciador CYP6P9 para estructuras de Hairpin	71
Cuadro 39. Resultados del análisis del iniciador CYP6P9 para formación de homodímeros y heteodímeros	72

Cuadro 40. Resultados del análisis del iniciador CYP6P4 en Oligo Analyzer	72
Cuadro 41. Resultados del análisis del iniciador CYP6P4 para estructuras de Hairpin	73
Cuadro 42. Resultados del análisis del iniciador CYP6P4 para formación de homodímeros y heteodímeros	73
Cuadro 43. Resultados del análisis del iniciador CYP6AA4 en Oligo Analyzer.....	74
Cuadro 44. Resultados del análisis del iniciador CYP6AA4 para estructuras de Hairpin	74
Cuadro 45. Resultados del análisis del iniciador CYP6AA4 para formación de homodímeros y heteodímeros	74
Cuadro 46. Resultados del análisis del iniciador CYP6P3 en Oligo Analyzer	75
Cuadro 47. Resultados del análisis del iniciador CYP6P3 para estructuras de Hairpin	75
Cuadro 48. Resultados del análisis del iniciador CYP6P3 para formación de homodímeros y heteodímeros	75
Cuadro 49. Resultados del análisis del iniciador CYP6P1 en Oligo Analyzer	76
Cuadro 50. Resultados del análisis del iniciador CYP6P1 para estructuras de Hairpin	76
Cuadro 51. Resultados del análisis del iniciador CYP6P1 para formación de homodímeros y heteodímeros	77
Cuadro 52. Resultados del análisis del iniciador CYP6M2 en Oligo Analyzer.....	77
Cuadro 53. Resultados del análisis del iniciador CYP6M2 para estructuras de Hairpin	78
Cuadro 54. Resultados del análisis del iniciador CYP6M2 para formación de homodímeros y heteodímeros	78

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Ciclo de vida del parásito causante de la malaria.	3
Figura 2. Mapa de la distribución de casos de malaria causados por <i>P. falciparum</i> en Guatemala.	5
Figura 3. Diagrama de mosquito hembra.	7
Figura 4. Distribución de los vectores de la malaria en América.	8
Figura 5. Árbol filogenético de las divisiones en órdenes del superorden <i>Endopterygota</i> (Whiting, 2001).....	10
Figura 6. Árbol filogenético de la relación entre el infraorden <i>Brachycera</i> y <i>Culicomorpha</i>	11
Figura 7. Árbol filogenético de los géneros que forman la familia Culicidae.	12
Figura 8. Árbol filogenético de Anofelinos.	13
Figura 9. Mapa de los países que utilizan como control del vector de la malaria.....	15
Figura 10. Uso de insecticidas para el control de la malaria reportado por WHOPES.....	16
Figura 11. Diagrama de la estructura secundaria de una citocroma P450.	22
Figura 12. Estructura de CYP101.	23
Figura 13. Diagrama de flujo del procedimiento para la validación in silicio de iniciadores...	38
Figura 14. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de diferentes insectos.....	48
Figura 15. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de insectos de la familia <i>Culicidae</i>	49
Figura 16. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos.....	51
Figura 17. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos.....	52
Figura 18. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP6 de diferentes insectos.....	54
Figura 19. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP6 de insectos de la familia <i>Culicidae</i>	55

Figura 20. Alineamiento de secuencias de mARN de la familia CYP9 de diferentes insectos.....	57
Figura 21. Alineamiento de secuencias de mARN de la familia CYP9 de insectos de la familia <i>Culicidae</i>	58
Figura 22. Región en donde se rediseñó el iniciador CYP9 R.....	59
Figura 23. Alineamiento de secuencias de mARN de la familia CYP9 de diferentes insectos.....	60
Figura 24. Alineamiento de secuencias de proteína de la familia CYP6 y CYP9 de insectos.....	62
Figura 25. Alineamiento de secuencias de mARN de la familia CYP6.....	70
Figura 26. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de diferentes insectos.	99
Figura 27. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de insectos de la familia <i>Culicidae</i>	102
Figura 28. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos.....	105
Figura 29. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos.....	108
Figura 30. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP6 de diferentes insectos.	111
Figura 31. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP6 de insectos de la familia <i>Culicidae</i>	120
Figura 32. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP9 de diferentes insectos.	125
Figura 33. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP9 de insectos de la familia <i>Culicidae</i>	134
Figura 34. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP9 de diferentes insectos.	138
Figura 35. Alineamiento completo de secuencias de proteína de la familia CYP6 y CYP9 de insectos.....	145
Figura 36. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP6.....	149

SINOPSIS

La resistencia a insecticidas en Anofelinos y otros vectores es un obstáculo para el control de enfermedades como la malaria en Guatemala. Debido a esto, es necesario contar con herramientas que permitan entender los mecanismos de resistencia a nivel molecular y poder detectarla en poblaciones del campo. Uno de los mecanismos de resistencia más común en cepas resistentes a insecticidas, es la detoxificación por medio de las enzimas citocromo P450.

En Guatemala, el principal vector de la malaria es *Anopheles albimanus*. Actualmente no se ha secuenciado el genoma de este mosquito por lo que se desconocen muchos genes, entre estos los miembros de la familia de los citocromo P450. Debido a que estos genes pueden impartir un mecanismo de resistencia, es importante identificarlos para poder analizar el papel que cumplen en la resistencia a insecticidas de *A. albimanus* en Guatemala.

El objetivo de este trabajo fue la validación *in silico* de iniciadores reportados en la literatura para la amplificación del ARNm de genes de las familias Citocromo P450 6 (CYP6) y 9 (CYP9) en *A. albimanus*. Esto se logró realizando alineaciones de secuencias de proteínas y mRNA de citocromos P450 de diferentes insectos, en programas de bioinformática tales como BLAST y ClustalW.

Los resultados indican que los iniciadores degenerados propuestos por Amenity, *et.al.*, 2005 para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9 se pueden utilizar en *A. albimanus*. Los alineamientos en ClustalW mostraron que los iniciadores fueron diseñados a partir de regiones altamente conservadas en diferentes insectos lo cual sugiere que estas regiones también se encuentran conservadas en *A. albimanus*. Se rediseñó el iniciador CYP9 R para que se pueda utilizar para amplificar CYP9 con diferentes secuencias ya que el propuesto por Amenity, *et.al.*, 2005 tiene una región que no se une a varias secuencias de CYP9. De los iniciadores específicos solamente el CYP6AA4 y CYP6P3 forward pueden amplificar genes homólogos directos de CYP6 de otras especies de Anopheles además de la que son específicos; sin embargo los iniciadores reversos de ambos CYP6 no pueden amplificar en otras especies, por lo que no se recomienda utilizar estos iniciadores para amplificar genes CYP6 en *A. albimanus*

Los resultados obtenidos a partir de este trabajo, se podrán utilizar en un futuro, para obtener secuencias de los genes de las familias CYP6 y CYP9 en *A. albimanus*, generando información necesaria para el análisis del papel de estas familias en la resistencia a insecticidas.

ABSTRACT

Insecticide resistance in Anophelines and other disease vectors is an obstacle for vector control in Guatemala. An understanding of the molecular mechanisms involved in insecticide resistance facilitates the development of tools for monitoring and new strategies for vector control. The most common mechanisms of resistance are associated with increased detoxification via cytochrome P450 (CYP).

The main malaria vector in Guatemala is *Anopheles albimanus*. The genome sequence of this mosquito is not complete yet; because of this, many gene sequences are unknown, including the CYP gene family. The CYP genes play a crucial role in insecticide resistance; it is important to identify these genes in *A. albimanus* to analyze their role in insecticide resistance in Guatemala.

The aim of this study was *in silico* primer validation for mRNA amplification from genes of the cytochrome P450 6 and 9 families in *A. albimanus*. Alignments of protein and mRNA sequences were done in BLAST and CLUSTALW to validate the primers.

The degenerate primers proposed by Ameyya, et.al., 2005 to amplify genes from CYP6 and CYP9 families could amplify CYP genes in *A. albimanus*. The alignments show that the primers were design based on highly conserved regions among different insects; this implies that in *A. albimanus* these regions are also conserved. The CYP9 reverse primer was redesigned to amplify CYP9 with different sequences because the one proposed by Ameyya et.al, 2005 had a region that didn't hybridize with several CYP9 sequences.

The results for the specific primers showed that only two set of primers might amplify homologues genes from other *Anopheles* species. The set of primers were CYP6AA4 and CYP6P3. Only the forward primer of the two sets presented an alignment with other CYP6; the reverse primer didn't showed alignments with other CYP. These set of primers might not amplify CYP6 genes in *A. albimanus*.

Primer *in silico* validation constitutes the first step to elucidating the role of these genes in insecticide resistance. In the future, the results of this investigation are going to allow researchers to amplify genes from de CYP6 and CYP9 families in *A. albmanus*. This will generate important information for the analysis of insecticide resistant mechanism and the role of these genes.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a insecticidas es definida como la selección de características heredables en una población de insectos que produce que los insecticidas utilizados para control de vectores, sean inefectivos (Aultman, *et. al.*, 2006).

Entre los métodos utilizados para el control del vector de la malaria en Guatemala está el uso de insecticidas en rociado intradomiciliar y en pabellones. Los insecticidas se utilizan para el control del insecto adulto para evitar que continúe la transmisión. (Zaim *et al.*, 2007). Actualmente la resistencia a insecticidas se ha observado en gran cantidad de vectores. Debido a esto, es importante estudiar los mecanismos que confieren resistencia a insecticidas. Uno de estos mecanismos es el aumento de enzimas detoxificadoras como las citocromas P450.

A. Albimanus es uno de los vectores principales de la malaria en Centro América, el Caribe y algunas regiones de norte y sur América. En Guatemala es el vector principal. Debido a que es el vector más importante, es necesario contar con herramientas que permitan controlarlo para evitar la transmisión de la malaria. Debido a que el genoma de *A. albimanus* no se ha secuenciado, se desconocen gran cantidad de genes, entre estos las citocromas P450 (Merida *et.al.*, 1999).

El objetivo de este trabajo fue la validación *in silico* de iniciadores degenerados reportados en la literatura para la identificación de los genes de las familias de citocromo P450 CYP6 y CYP9 en *A. albimanus*. La validación de iniciadores específicos reportados para los genes CYP6P4, CYP6AA4, CYP6P3, CYP6M2 y CYP6P9 implicados en la resistencia a insecticidas piretroides en *A. funestus* y *A. gambiae*, y determinar si estos iniciadores se pueden utilizar para amplificar genes de *A. albimanus*.

II. MARCO TEÓRICO

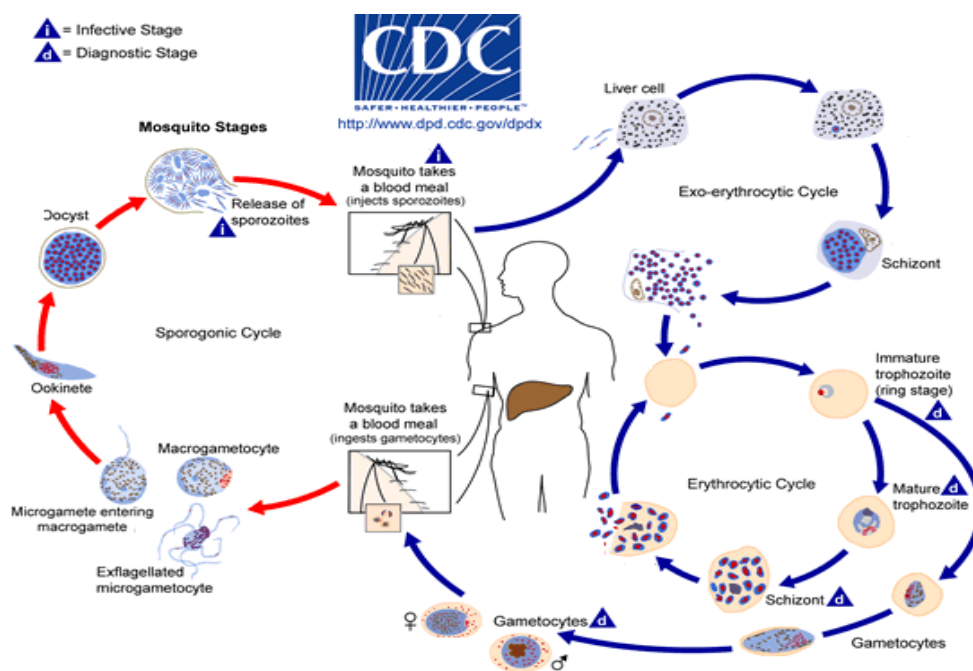
A. Malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria causada, en el humano, por 4 especies diferentes de *Plasmodium* (CDC. Life cycle of malaria, 2004) (Burton et. al., 2005).

El parásito se desarrolla en dos hospederos, en el vector que es el mosquito hembra del género *Anopheles* y en el humano (CDC. Life cycle of malaria, 2004) (Burton et. al., 2005).

Figura 1. Ciclo de vida del parásito causante de la malaria.

Modificado de: Centers for disease control and prevention. Schema of the life cycle of malaria. 2006



Fuente: http://www.cdc.gov/Malaria/biology/life_cycle.htm

El ciclo de vida de la malaria se divide en dos fases, una asexual esquizogonia y una sexual gametogonia. La fase sexual ocurre en el mosquito hembra *Anopheles* y la fase asexual en los humanos (CDC. Life cycle of malaria, 2004) (Burton et. al., 2005).

El ciclo de vida se inicia cuando una hembra de mosquito *Anopheles* ingiere sangre y secreta en la saliva esporozoitos. Esta fase infectiva es depositada debajo de la epidermis del humano, directamente al torrente sanguíneo. Los esporozoitos migran a las células parenquimales del hígado en donde se desarrolla hasta llegar a esquizonte. La preferencia por las células del hígado se debe al reconocimiento de la capa de recubrimiento del circumesporozoito por receptores en las células del hígado. Dentro del hepatocito el esporozoito madura hasta trofozoito. Esta fase se alimenta del citoplasma de la célula del hígado. A continuación el núcleo del trofozoito se divide varias veces, seguido por una división del citoplasma. Este proceso de división produce miles de merozoitos. Estos son liberados al romperse la célula del hígado. Esta fase que ocurre en el hígado, es la fase exo-eritrocitaria. Los merozoitos liberados pasan al torrente sanguíneo en donde infectan eritrocitos. Al igual que con las células del hígado, los merozoitos entran a las células sanguíneas por el reconocimiento de receptores. La fase de infección de los eritrocitos se conoce como fase eritrocitaria esquizogónica (CDC. Life cycle of malaria 2004) (Burton *et. al.*, 2005).

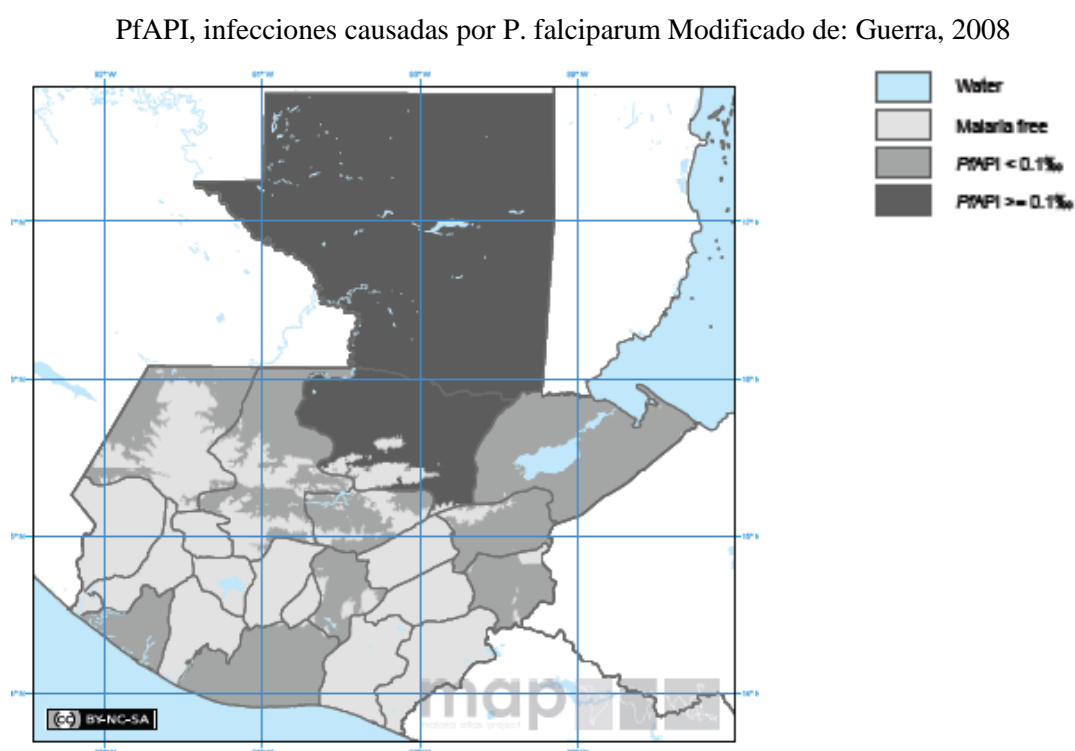
Dentro del eritrocito el merozoito crece hasta una etapa temprana del trofozoito. Esta es la fase en forma de anillo que se utiliza como diagnóstico. En esta etapa se presenta la vacuola del parásito, llena de hemoglobina del hospedero. A continuación el trofozoito sufre una múltiple división y se transforma en esquizonte. Este esquizonte se rompe liberando merozoitos, los cuales pueden infectar otros eritrocitos. Otro destino que pueden seguir los merozoitos es el desarrollarse hasta llegar a machos microgametocitos y hembra macrogametocitos (CDC. Life cycle of malaria, 2004) (Burton *et. al.*, 2005).

La fase sexual, que se da en el mosquito, inicia con la ingestión de sangre de un humano infectado. El mosquito ingiere el microgametocito y el macrogametocito. Dentro del mosquito ocurre la exaflagelación del microgametocito, fase durante la cual se divide produciendo de 6-8 núcleos que migran a la periferia del gametocito; en esta fase el microgametocito pasa a ser microgameto. El gametocito hembra pasa a ser macrogametocito. Ocurre la fusión del gameto macho y hembra. Después de 12-24hrs se forma el ooquineto. El ooquineto penetra la pared del intestino del mosquito en medio del epitelio y la lámina basal en donde se desarrolla hasta ooquiste con esporozoitos. Finalmente el mosquito ingiere sangre nuevamente, y libera los esporozoitos (CDC. Life cycle of malaria 2004) (Burton *et. al.*, 2005).

1. Malaria en Guatemala. En el 2003 se registraron aproximadamente 30,000 casos de malaria. Los casos se dieron en un 40% en Alta Verapaz, 32% en Petén, 6% en Quiché, 5% en Baja Verapaz, 4% en Huehuetenango, 4% en Escuintla y 3% en Izabal. El 17.1% se dio en niños menores de 5 años, el 32% en niños entre 5-14 años y el 40% en personas entre 15-49 años (Korenromp, *et.al.*, 2005).

El principal causante de malaria en Guatemala es *Plasmodium vivax* que produce 97% de los casos y *Plasmodium falciparum* el 3%. En la Figura 2 se muestra un mapa con la distribución de casos de malaria causados por *P. falciparum*. Los principales vectores de la malaria tanto por *P. vivax* como *P. falciparum* son *A. albimanus*, *A.pseudopuntipennis*, y *A. darlingi* (PAHO, 2007) (CDC. Malaria en Guatemala. MERTU/G, 2004).

Figura 2. Mapa de la distribución de casos de malaria causados por *P. falciparum* en Guatemala.



B. Descripción de *Anopheles*

La malaria es transmitida por los mosquitos del género *Anopheles*. De las 444 especies de *Anopheles* solamente entre 30-40 son vectores de la malaria (CDC. *Anopheles Mosquitoes*. Biology 2008).

1. Ciclo de vida. Los Anofelinos pasan por cuatro fases en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Las primeras tres fases son acuáticas y esta dura de 5-14 días dependiendo de la temperatura. En la etapa adulta es cuando puede transmitir la malaria (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).

- a. Huevo: los huevos son depositados por las hembras en el agua. Estas depositan entre 50-200 huevos por ovipostura. Estos eclosionan de 2-3 días después (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology, 2008).
- b. Larva: este estadio posee una cabeza desarrollada con boca en forma de cepillo, la cual usan para alimentarse. Poseen también, un tórax largo y abdomen segmentado. En este estadio no poseen patas a diferencia de otros mosquitos. Tampoco posee un sifón respiratorio sino espiráculos que se localizan en el octavo segmento del abdomen. Las larvas viven en la superficie de los hábitats acuáticos lo que les permite respirar. Ésta se alimenta de bacterias y algas que encuentra en la superficie. Este período larvario está compuesto por cuatro subetapas en las que cambia de exoesqueleto (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).
- c. Pupa: en esta etapa, la cabeza y el tórax están juntos en el cefalotórax con el abdomen curvo debajo. Al igual que la larva, la pupa sale a la superficie del agua para respirar. En esta etapa, posee unas trompetas en el cefalotórax que le permiten respirar. Al terminar este estadio, se quiebra el cefalotórax y sale el mosquito adulto (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).
- d. Adultos: el cuerpo de estos está dividido en cabeza, tórax y abdomen. La cabeza contiene los ojos, un par de antenas segmentadas, la proboscis y papulas sensitivas. Las antenas le permiten captar olores, y en las hembras sirve para escoger sitios para la ovipostura. La proboscis y las pápulas sensitivas las utiliza para alimentarse. Solamente las hembras poseen una proboscis que les permite penetrar la piel humana, por lo que solamente estas ingiere sangre y pueden transmitir la malaria (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).

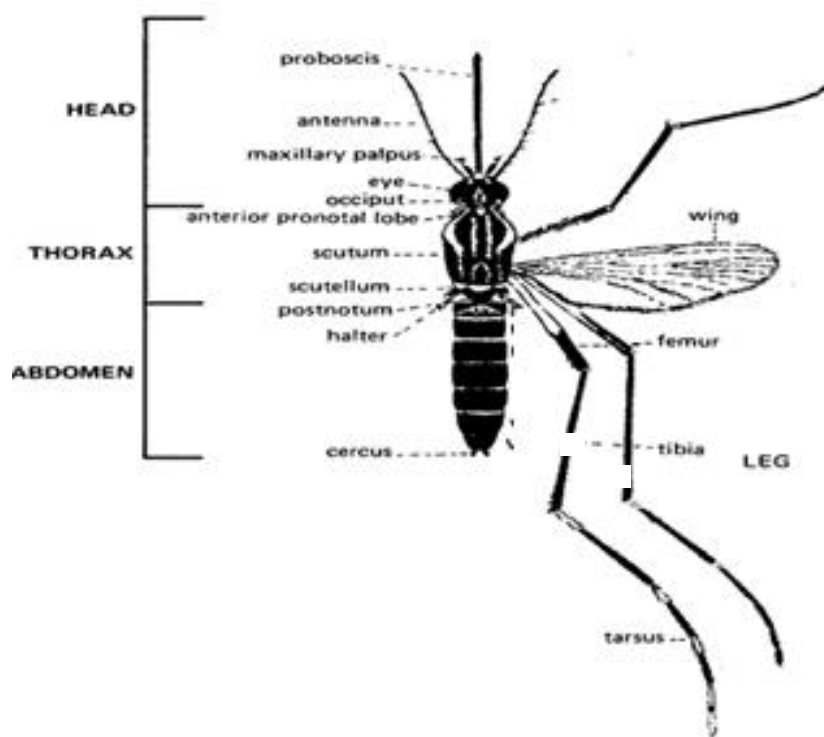
El tórax está compuesto por tres pares de patas y un par de alas que le permiten movilizarse (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).

El abdomen está segmentado y se expande cuando se alimentan. Esta parte está especializada en la digestión y desarrollo de los huevos (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).

Los adultos se aparean unos días después de salir de la pupa. Los machos viven aproximadamente una semana, y se alimentan de fuentes de azúcar. Las hembras viven alrededor de 1-2 semanas, y se alimentan de sangre para el desarrollo de los huevos y de azúcar para obtener energía. Después que las hembras ingieren sangre, descansan de 2-3 días, en condiciones tropicales, para la digestión de la sangre y el desarrollo de los huevos (CDC. Anopheles Mosquitoes. Biology 2008).

Figura 3. Diagrama de mosquito hembra.

Modificado de: Centers for Disease control and prevention. Anopheles Mosquitoes. Biology. 2008. Atlanta, Estados Unidos



Página web. <http://www.cdc.gov/malaria/biology/mosquito/>

En Guatemala solamente *A. vestitipennis*, *A. Pseudopunctipennis*, *A. darling* y *A. albimanus* están asociados a la transmisión de la malaria (Padilla 1997). En la figura 4 se observa el mapa de distribución de vectores de la malaria en América.

**Figura 4. Distribución de los vectores de la malaria en América.
Modificado de: Kiszewski, 2004**



C. Filogenética de Anofelinos

Los mosquitos del género *Anopheles* tiene importancia médica como vectores de enfermedades como la malaria; sin embargo se conoce muy poco sobre la filogenética de estos. Esto se debe a que algunas especies no tiene un genoma secuenciado como *A. albimanus* y otras sí están secuenciadas como *A. gambiae* (Slakwr *et.al.*, 2001).

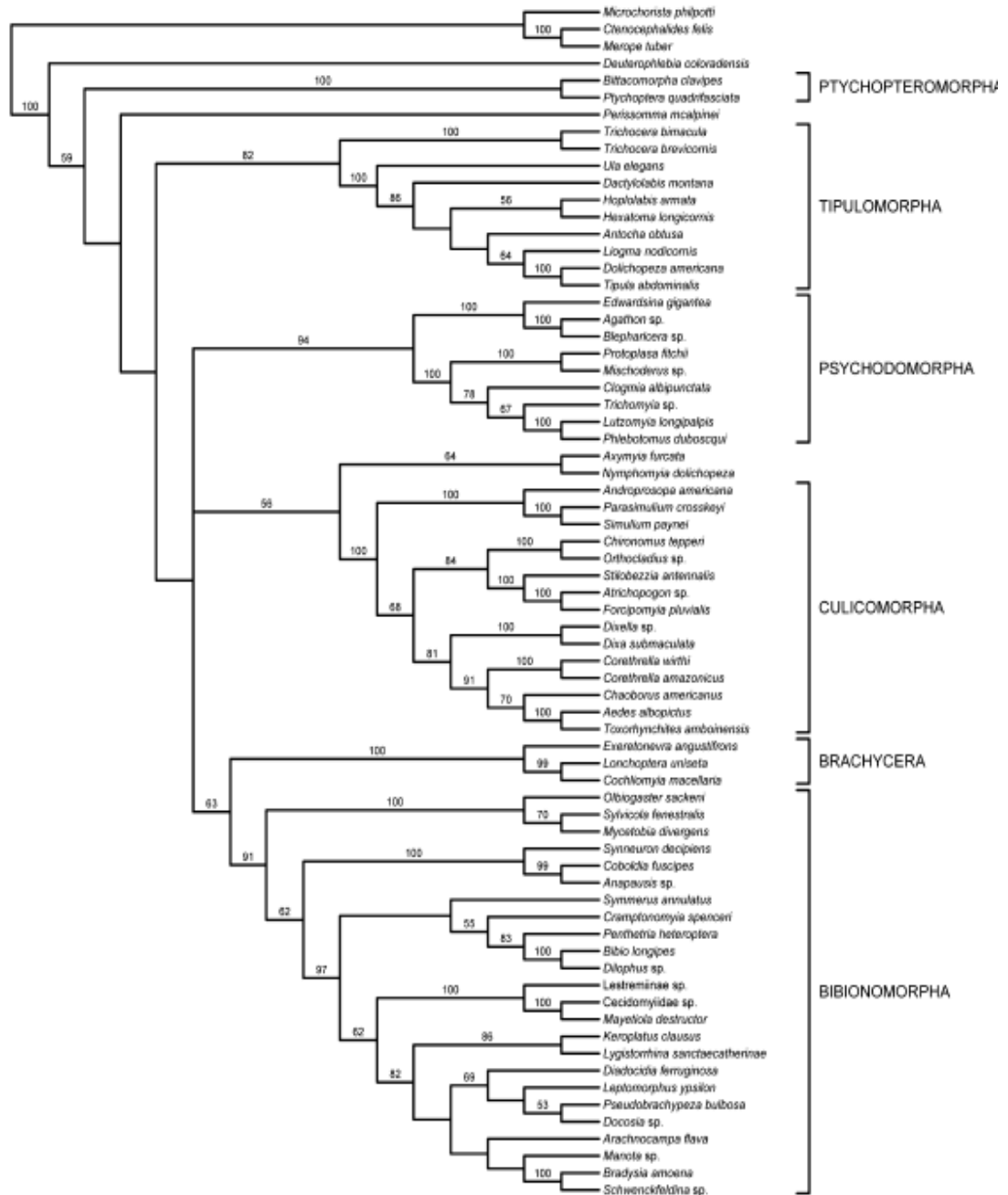
La clasificación taxonómica del mosquito *A. albimanus* es la siguiente (ITIS 1996):

Reino	Animalia
Filo	Artropoda
Subfilo	Hexapoda
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
Infraclasse	Neoptera
Superorden	Endopterygota
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Infraorden	Culicomorpha
Familia	Culicidae
Subfamilia	Anophelinae
Género	Anopheles
Especie	Anopheles albimanus Wiedemann

Como se observa en la clasificación taxonómica los anofelinos pertenecen al orden *Diptera* dentro del cual también se clasifican una gran diversidad de organismos como *Musca domestica* y *Drosophila melaogaster*.

En la Figura 5 se encuentra la relación filogenética entre el orden *Diptera* y *Lepidoptera*. Al primer orden pertenecen los Anofelinos, *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. Aegypti*, *D. melanogaster* y *M. domestica*; mientras que al orden *Lepidoptera* pertenece *Helicoverpa armígera* y *Heliothis virescens*. (ITIS 1996).

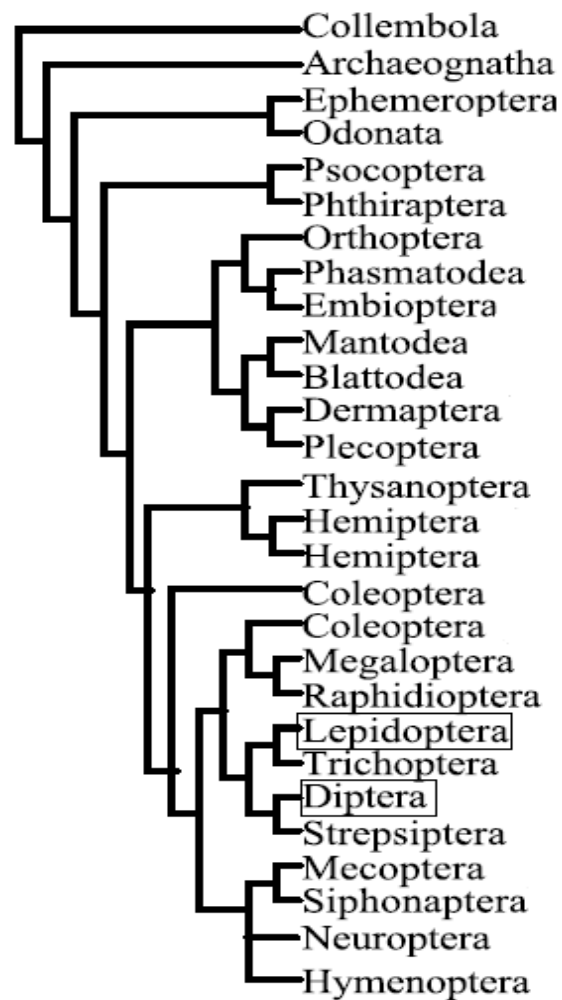
Figura 5. Árbol filogenético de las divisiones en órdenes del superorden *Endopterygota* (Whiting, 2001)



Así mismo los Anofelinos pertenecen al infraorden *Culicomorpha* y *Brachycera* al que pertenecen *D. melanogaster* y *M. domestica*. En la figura 6 se muestra la relación filogenética entre el infraorden *Culicomorpha* y *Brachycera* (ITIS, 1996).

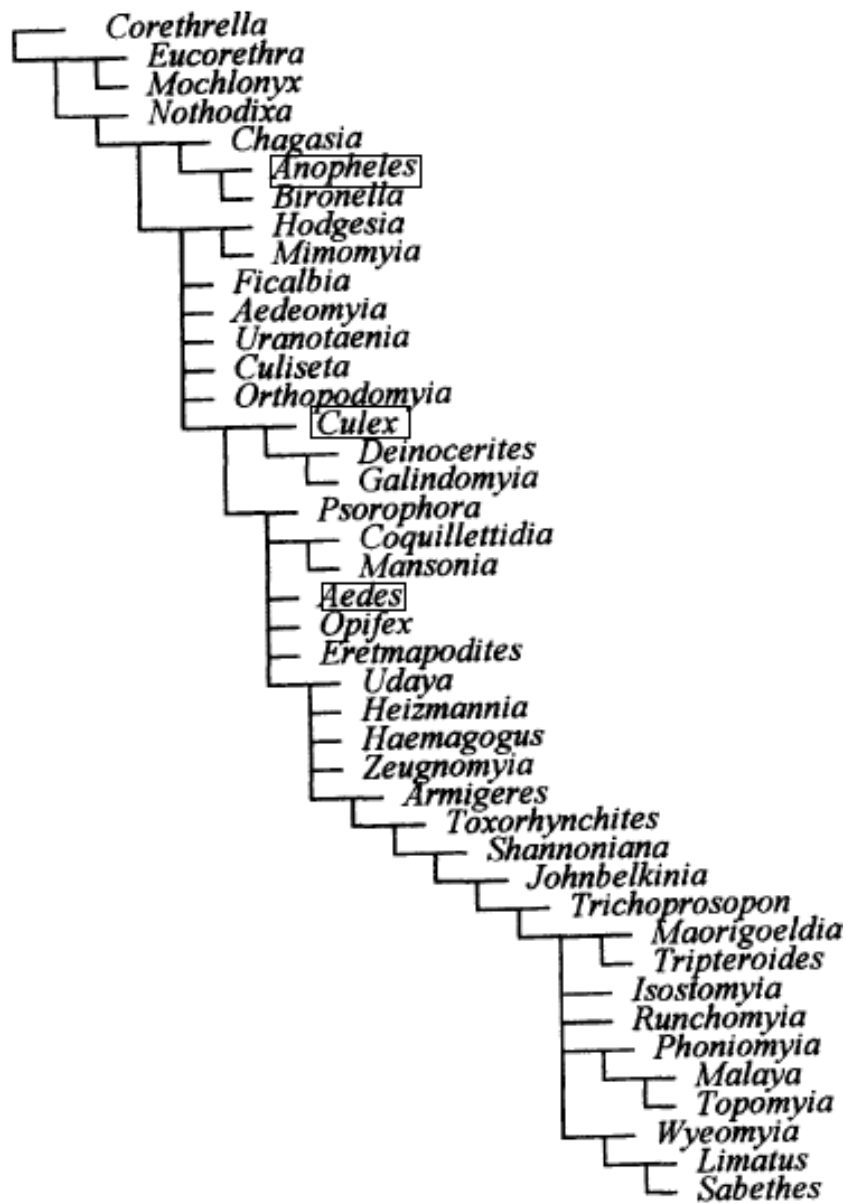
Figura 6. Árbol filogenético de la relación entre el infraorden *Brachycera* y *Culicomorpha*.

Modificado de: Bertone 2008.



Los Anofelinos se encuentran dentro de la familia *Culicidae* a la cual pertenecen otros vectores de enfermedades como *Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*. En la figura 7 se muestra la relación filogenética entre los diferentes géneros que forman la familia *Culicidae* (ITIS 1996).

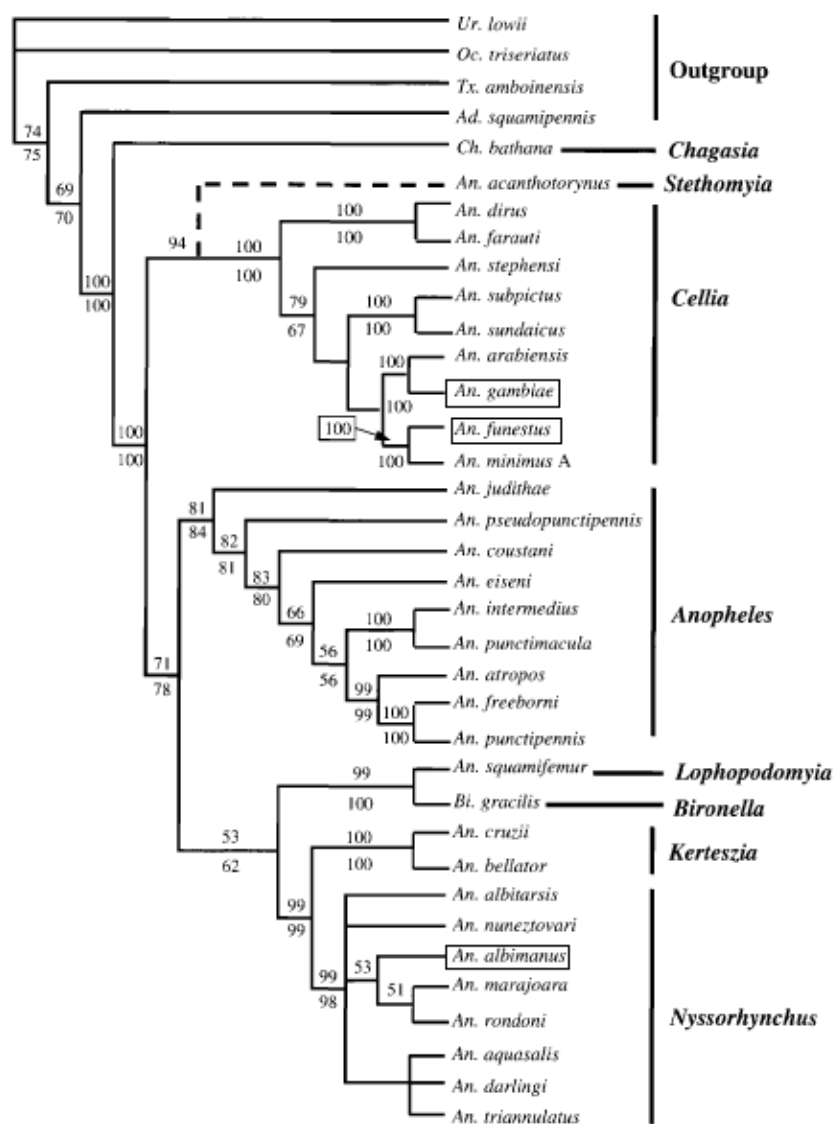
Figura 7. Árbol filogenético de los géneros que forman la familia Culicidae.
El género *Anopheles* contiene todos los mosquitos Anofelinos como *A. albimanus*. *Cx. quinquefasciatus* pertenece al género *Culex* y *Ae. Aegypti* a *Aedes*.



El género incluye 444 especies clasificadas y 40 clasificadas provisionalmente. Existen seis subgéneros: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia*, *Lophodomyia*, *Nyssorhynchus* y *Stethomyia*. En la Figura 8 se muestra la relación filogenética entre estos subgéneros así como algunas especies de Anofelinos. Entre éstas especies hay vectores importantes, como *A. gambiae*, *A. funestus* y *A. albimanus* (Sallum, *et.al.* 2002).

A continuación se muestra una figura con la relación filogenética entre diferentes vectores de la malaria en Latinoamérica.

Figura 8. Árbol filogenético de Anofelinos.
Análisis de parsimonia utilizando aproximaciones por peso sucesivas de secuencias de rADN y mtADN. Los números arriba y debajo de las ramas indican las proporciones de MP Bootstrap obtenidas. Tomado de Sallum, *et.al.* 2002.



D. Control de vectores

El control de vectores se refiere a los métodos utilizados para disminuir el contacto entre el humano y vectores de enfermedades, como *Anopheles albimanus* que transmite la malaria. Esta es una de las medidas más efectivas para la prevención de la transmisión de esta enfermedad (CDC. Vector Control, 2008) (Zaim *et al.* 2007).

Entre los métodos para el control de vectores y prevención de la malaria están:

1. Redes de cama tratadas con insecticida (Insecticide-treated bed nets ITN). Este método, como su nombre lo indica, consisten en la impregnación de redes de cama con insecticida. La red proporciona protección contra las picaduras de mosquito; mientras que el insecticida mata a los mosquitos que llegan a la red. Así mismo, posee características repelentes ya que disminuye la cantidad de mosquitos que entran a las casa para alimentarse (CDC. Vector Control 2008).

Actualmente se utilizan insecticidas piretroides para rociar las redes. Este tipo de insecticida posee baja toxicidad para los mamíferos, pero es altamente tóxico para los insectos, además no se degradan rápidamente. Las redes deben ser tratadas con insecticida cada 6-12 meses (CDC. Vector Control 2008).

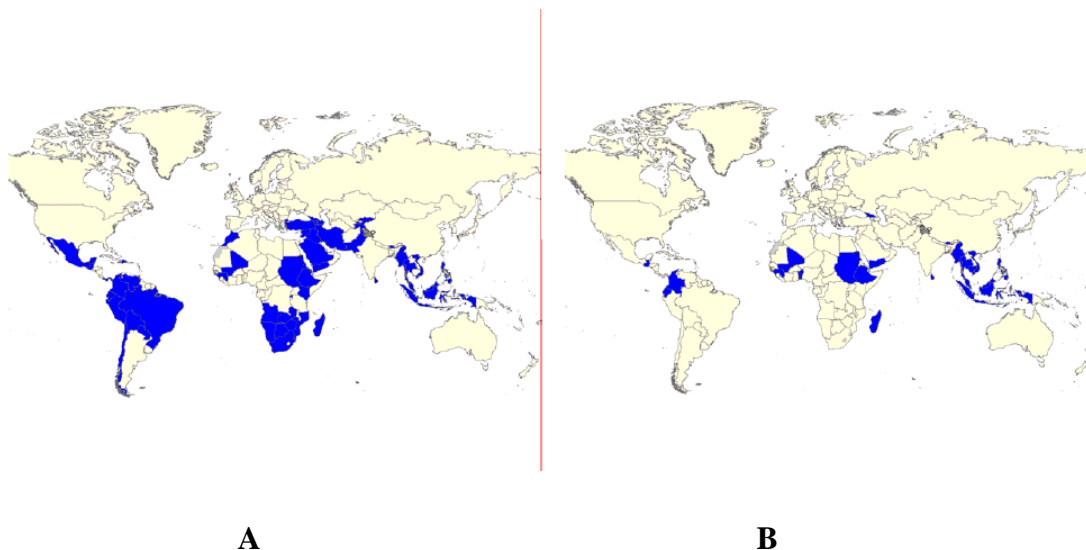
Ahora existen redes tratadas con insecticida que dura más tiempo. Estas retienen concentraciones letales de insecticida hasta por tres años. Estas redes también son rociadas con insecticidas piretroides (CDC. Vector Control 2008).

2. Aplicación de insecticida en interiores (Indoor residual spraying). Este método implica el rociado de paredes y otras superficies de las viviendas con insecticida. Por varios meses el insecticida puede matar mosquitos que entran en contacto con las superficies rociadas. Actualmente se utiliza DDT como insecticida (CDC. Vector Control, 2008).

Por lo general los mosquitos después de la ingesta sanguínea, permanecen dentro de las casas en donde picaron. Por lo que este método no previene las picaduras, pero sí previene la transmisión de la malaria (CDC. Vector Control 2008).

En la Figura 9 se muestra un mapa con al distribución del uso de redes de cama tratadas con insecticida y rociado de interiores.

Figura 9. Mapa de los países que utilizan como control del vector de la malaria. Redes de cama tratadas con insecticida en A y en dónde se utiliza el rociado de interiores en B. Modificado de: (Zaim *et al.* 2007).

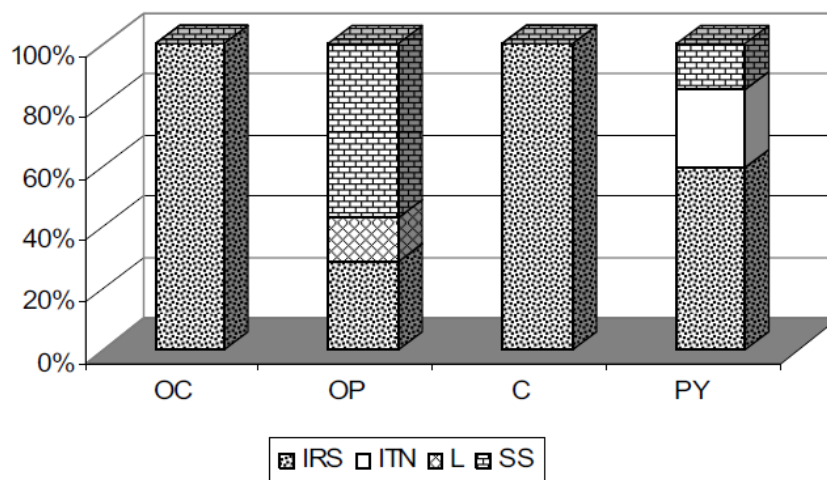


3. Reducción de fuentes de larvas (source reduction for larval control). Este método consiste en la destrucción o reducción de posibles hábitats para el desarrollo de larvas de mosquito. Este método es utilizado para el control de mosquitos cuando hay baja concentración de estos en un número pequeño de hábitats. Este método elimina al mosquito antes que alcance el estadio en el que puede transmitir la malaria (CDC. Vector Control, 2008).

4. Otros métodos: estos métodos incluyen el rociado de áreas extensas. Este método está reservado solamente para situaciones de emergencia en lugares donde hay epidemias. Este método consiste en rociar con insecticida áreas abiertas para matar a los mosquitos cuando estos se han convertido en una peste. Otro método es la liberación de machos estériles, así como la futura modificación genética de los mosquitos (CDC. Vector Control 2008).

A continuación se muestra en la Figura 10 el uso global de insecticidas para el control de la malaria y los diferentes métodos de control.

Figura 10. Uso de insecticidas para el control de la malaria reportado por WHOPES. Clase de insecticida y método de aplicación durante los años 2003-2005. Las clases de insecticidas son: OC. Organoclorados, OP. Organofosforados, C. carbamatos y PY. Piretroides. IRS: aplicación de insecticidas en el interior. ITN: redes tratadas con insecticidas SS: aplicación de insecticidas en grandes áreas. Modificado de: (Zaim *et al.* 2007).



Se observa en la figura que solamente los insecticidas piretroides son utilizados en redes de cama. Esto se debe a que poseen baja toxicidad y no se degradan fácilmente como otros insecticidas. También se muestra que se utilizan insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos para el rociado intradomiciliario y aplicación en grandes áreas.

E. Resistencia a insecticidas

La resistencia a insecticidas se define como la selección de características heredables en una población de insectos que evita que los insecticidas sean efectivos para el control de vectores (Aultman, *et. al.* 2006).

Los insecticidas cumplen un papel importante en los programas de control de vectores. Estos son utilizados en interiores, exteriores, en redes para cama etc. A causa de esto algunos mosquitos han desarrollado resistencia debido a la exposición prolongada a los insecticidas. Debido a que los mosquitos pueden tener varias generaciones por año, la resistencia se

desarrolla rápidamente. Se han reportado más de 125 especies de mosquitos resistentes a uno o más insecticidas; entre estos *A. Albimanus* (CDC. Vector Control, 2008).

F. Factores que influyen en la resistencia a insecticidas

De acuerdo con la organización mundial de la salud los factores que influyen el desarrollo de la resistencia a insecticida son los siguientes:

1. Genéticos

- a. Tasa de mutación y frecuencia para los genes de resistencia
- b. Penetración, expresión y dominancia de los genes de resistencia
- c. Qué tan adecuado es el fenotipo del insecto (WHO, 2003).

2. Reproductivos

- a. Generaciones por año
- b. Tasa de incremento y fluctuación en el tamaño de la población
- c. Monogamia/poligamia partenogénesis y otras variaciones (WHO, 2003).

3. De comportamiento/Ecológicos

- a. Migración dentro y fuera de la población expuesta
- b. Evitar los insecticidas
- c. Variación de condiciones ecológicas
- d. Monofagia y polifagia (WHO, 2003).

4. Operacionales

- a. Proporción de la población expuesta a dosis selectivas
- b. Dosis de insecticida ingerido por los insectos expuestos.
- c. Persistencia del insecticida
- d. Existencia de refugios sin rociar
- e. La ruta de exposición
- f. Estadío en el que fue expuesto
- g. Integración de insecticidas con métodos de control biológicos o genéticos
- h. Uso de mezcla de insecticidas y patrón de aplicación
- i. Liberación de machos susceptibles (WHO, 2003).

G. Mecanismos de resistencia

Existen diferentes formas de resistencia a insecticidas, entre éstas están:

1. Resistencia por comportamiento. Esta resistencia se refiere a una modificación en el comportamiento del insecto lo cual evita el efecto dañino de los insecticidas; por ejemplo cuando los mosquitos evitan cierto lugar que fue rociado con insecticida, esto es resistencia por comportamiento (Aultman, *et. al.* 2006) (WHO 2003).

2. Resistencia de penetración. Esta resistencia se da cuando hay modificaciones en la cutícula del insecto o en el tracto digestivo. Esto previene la penetración del insecticida o causa que sea lenta. Si existe penetración del insecticida, debido a que es lenta, el insecto puede activar las enzimas detoxificantes reduciendo así el daño. Este tipo de mecanismo se ha identificado solamente en moscas domésticas (Aultman, *et. al.* 2006) (WHO 2003).

3. Resistencia metabólica. Este tipo de resistencia se refiere a la modificación de las rutas metabólicas de detoxificación. Este mecanismo y el de resistencia por alteración del sitio blanco son los más comunes. Es mediada por cambios en la actividad de enzimas detoxificadoras. Existen varias enzimas que participan en la detoxificación como lo son: las esterasas, monooxigenasas del citocromo P450 y glutatión S-transferasas. Por lo general se observa un incremento en los metabolitos que producen estas enzimas (Aultman, *et. al.* 2006) (Hemingway 2002).

4. Resistencia por alteración del sitio blanco. Es el mecanismo de resistencia más común en los insectos. Por lo general los insecticidas actúan sobre un sitio blanco en específico, por ejemplo el sistema nervioso del insecto. Cuando ocurre una mutación en este sitio blanco, el insecticida ya no puede unirse al sitio. Esto hace que el insecticida no afecte, o afecte menos al insecto (Aultman, *et. al.* 2006) (Hemingway 2002).

En *Culex spp.* se han encontrado mutaciones en la acetilcolinesterasa, sitio blanco de los insecticidas organofosfatados y carbamatos. También se han encontrado la mutación conocida como “knockdown resistance”, esta consiste en un cambio en la secuencia de aminoácidos del canal de sodio de las células nerviosas del insecto; esto produce una reducción en la sensibilidad de la unión del canal con insecticidas como el DDT y los piretroides. Este tipo de mutación se ha encontrado en *A. gambiae* en África (Aultman, *et. Al.* 2006) (Hemingway 2002).

H. Tipos de insecticidas utilizados para el control de la malaria

1. Organoclorados. Son los más utilizados en servicios de salud. Estos insecticidas contienen carbono, hidrógeno y cloro. Este grupo se puede dividir en tres categorías: DDT y análogos, hexacloro-ciclo-hexano, y compuestos ciclodieno. Este tipo de insecticidas ataca el sistema nervioso del insecto. Entre los insecticidas de este tipo más utilizados en el control de vectores están: DDT, heptacloro, endrina, endosulfán y dieldrina (WHO 2003).

2. Organofosfatados. Presentan un amplio espectro insecticida con la ventaja de ser poco tóxicos para los mamíferos. La mayoría de insecticidas que pertenecen a este grupo son esteres o amidas con un enlace orgánico a un ácido fosfórico o pirofosfórico. El mecanismo de acción consiste en la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas, por lo que inhibe la función de la enzima (WHO 2003).

Ejemplos de este tipo de insecticidas que son utilizados para el control de la malaria están: fenitroion, temephos, clorpirifos, fenitroion, pirimifos-metil y malation (WHO 2003).

3. Carbamatos. Estos son ácidos de éster. Estos insecticidas afectan el receptor de la acetilcolinesterasa. Ejemplos de este tipo de insecticida utilizado contra la malaria es el Propoxur (WHO 2003).

4. Piretroides. Son insecticidas sintéticos, similares químicamente a las piretrinas extraídas de los Crisantemos. Estas piretrinas naturales han sido modificadas para hacerlas más estables en el ambiente y que puedan ser utilizadas como insecticidas. Estos insecticidas actúan paralizando el sistema nervioso del insecto (WHO 2003).

Tienen baja toxicidad para los humanos y una acción rápida contra un gran espectro de insectos. Poseen baja polaridad y volatilidad propiedades que restringe su movimiento en el aire y suelo del sitio de donde fueron aplicados. Los insecticidas de este tipo más utilizados en el control del vector de la malaria son: permetrina, deltametrina, etofenprox entre otros. (WHO 2003).

A continuación se presenta un cuadro con los insecticidas más utilizados para el control del vector de la malaria en Guatemala (WHO 2003).

Cuadro 1. Insecticidas utilizados en Guatemala para el control de la malaria. 1995-2005 (Zaim et al., 2007).

Año	Tipo de Insecticida (Kg de ingrediente activo)		
	Organofosforados	Carbamatos	Piretroides
1995	273	650	543
1996	266	11620	454
1997	3547	12000	3968
1998	1108	4592	66
1999	530	494	194
2000	532	3420	640
2001	10 872	355	0
2002	494	959	704
2003	492	3642	454
2004	582	2254	24
2005	909	1512	0

I. Resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus*

En Guatemala se han realizado pocos estudios sobre la resistencia a insecticidas en *A. albimanus*. La mayoría de estos estudios se realizaron durante la década del 90. Uno de estos reportó la resistencia a organofosforados y piretroides por medio del mecanismo detoxificante de las esterasas (Beach 1989).

En 1989 se demostró resistencia a fenitrotión en *A. albimanus* con un método enzimático y por el ensayo de la Organización Mundial de la Salud. (Beach, 1989). Luego en 1990 se reportó la resistencia a carbamatos por el mecanismo de alteración del sitio blanco. (Cordón-Rosales, 1990). En 1992 se detectó resistencia a organofosforados por el mecanismo de acetilcolinesterasa insensible y altos niveles de esterasas. Por último, en 1999 se reportó la resistencia a piretroides y DDT debido a un alto nivel de oxidasas y esterasas (Brogdon, 1999).

J. Monooxigenasas Citocromo P450

Las citocromas P450 son una familia de enzimas que se encuentran en una gran cantidad de organismos incluyendo los insectos. Éstas están involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios, el transporte y el catabolismo de xenobióticos como los insecticidas. Son hemoproteínas, es decir contiene un grupo prostético hemo. La superfamilia de genes P450 se subdivide y clasifica con base a la identidad de los aminoácidos, criterios filogenéticos y por la organización de los genes. La nomenclatura consiste en el símbolo CYP seguido por el número de la familia, que son grupos de proteínas con un 40% de identidad; luego sigue la letra de la subfamilia y por último el número del gen. Los grupos de proteínas de las subfamilias poseen >55% de identidad. Un ejemplo de esta nomenclatura es el CYP6P9 en donde 6 es la familia, P la subfamilia y 9 el número de gen (Guengerich 1991) (Omura 1999) (Werck 2000).

Las principales familias de CYP, en diferentes insectos, que se asocian a la resistencia a insecticidas son CYP4, CYP6 y CYP9 (Hemingway 2000).

1. Mecanismo enzimático. La reacción general mediada por las enzimas monooxigenasas P450 es:

En este caso, el RH es el sustrato y la flavoproteína NADPH se utiliza para reducir equivalentes. Las monooxigenasas P450 poseen un gran número de isoformas por lo que pueden metabolizar diferentes sustratos. En los eucariotas la mayoría de estas enzimas se localizan en el retículo endoplásmico y la mitocondria (Scott 2001).

2. Características estructurales. Las citocromas P450 se dividen en cuatro clases dependiendo del método por el cual los electrones del NADPH son llevados al sitio catalítico. Las proteínas del tipo I requieren una reductasa con FAD y una redoxina con ión sulfuro. La clase II requieren una P450 reductasa con FAD/FMN. La Clase III no requiere donador de electrones, pero la clase IV recibe electrones directamente del NADPH (Werck 2000).

La conservación en las diferentes secuencias de citocromo P450 es relativamente baja, pero existen tres sitios conservados. Las estructuras cristalográficas han mostrado una conservación general de la topografía y el plegamiento. El núcleo o centro de la proteína se encuentra altamente conservado, alrededor del grupo hemo. Esto refleja un mecanismo en común de transferencia de electrones, protones y activación de oxígeno. El centro conservado

está formado por cuatro hélices D, E, I y L; posee también hélices J y K y dos pares de hojas β . Esos plegamientos constituyen la región de unión al grupo hemo. La familia se puede identificar por esta región conservada de la proteína, que tiene la secuencia Fen-X-X-Gli-X-Arg-X-Cis-X-Gli. Otra región conservada en la hélice K cercana a la región de unión al grupo hemo es la región Glu-X-X-Arg. La última región conservada se encuentra en la parte central de la hélice I, esta también permite identificar las proteínas de la familia P450. La secuencia de la región es Ala/Gli-Gli-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser); esta región corresponde al sitio de intercambio de protones (Werck 2000).

Figura 11. Diagrama de la estructura secundaria de una citocroma P450.
Lo rectángulos azules son hélices α , y las flechas beige son hojas β . El primer dominio es asociado con el reconocimiento al sustrato y el segundo dominio al centro catalítico.
Tomado de: Werck 2000

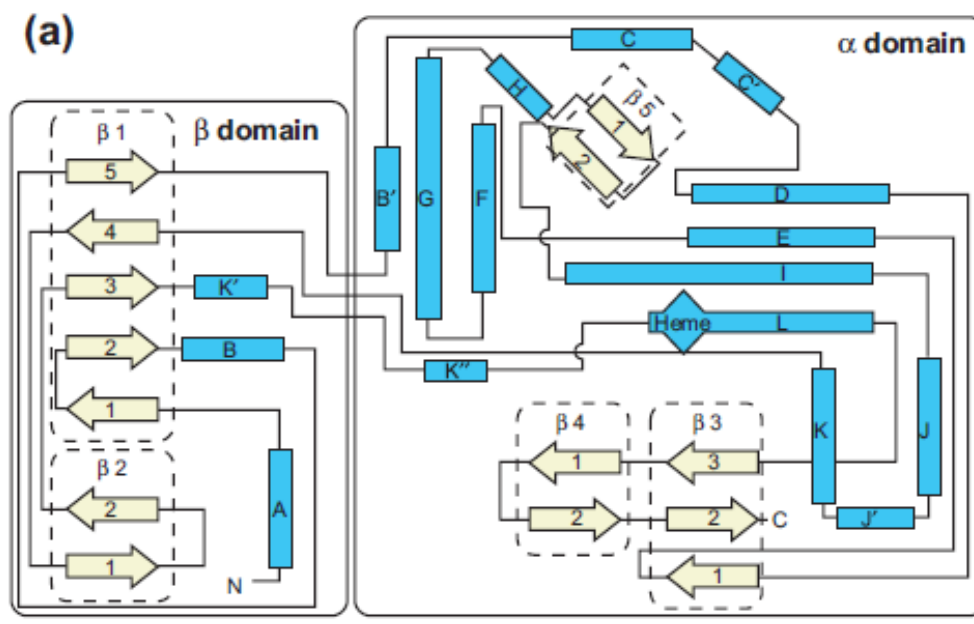
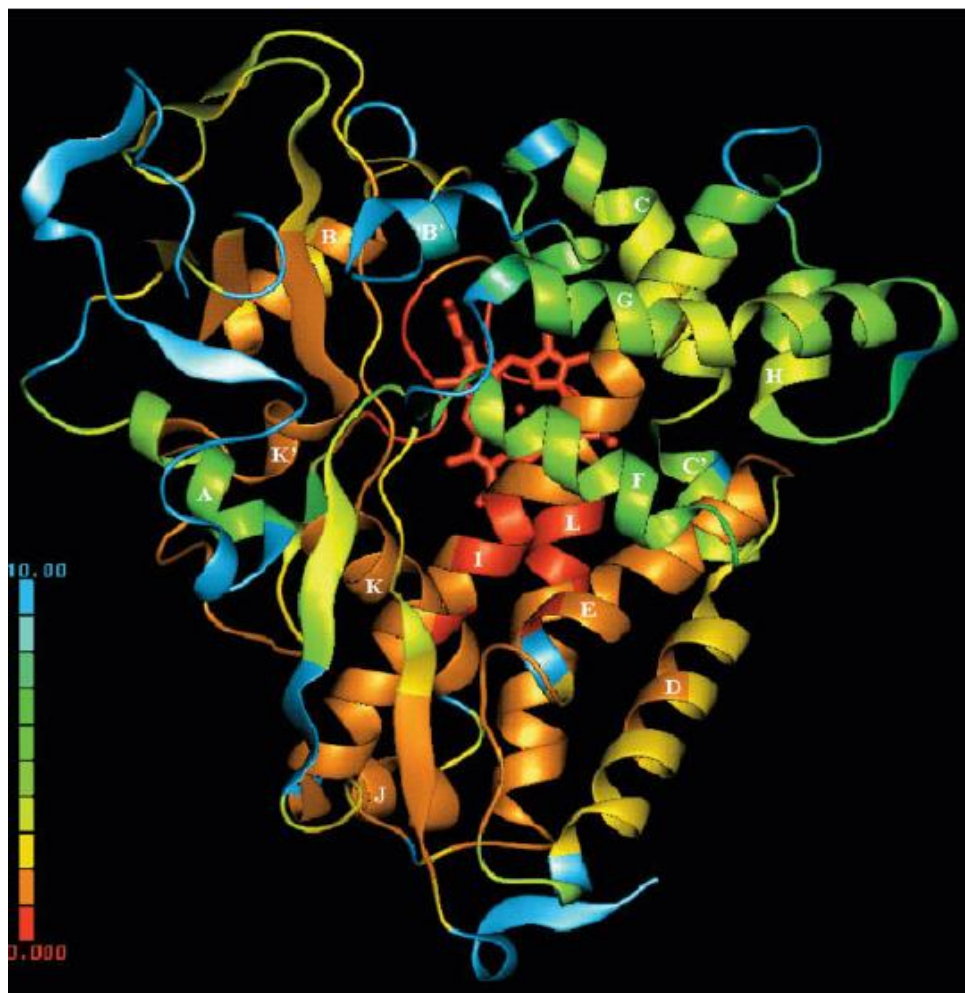


Figura 12. Estructura de CYP101.

Se observa el grupo hemo en color rojo. Se observa la hélice K e I las cuales presentan las regiones conservadas. También se observa la hélice L cercana al grupo de unión al hemo, otra región conservada. Tomado de: Mestres 2005.



K. Resistencia por medio del citocromo P450

Uno de los mecanismos de resistencia a insecticidas más común es la resistencia metabólica. Ésta involucra un incremento en la capacidad de los sistemas de detoxificación. Este mecanismo de resistencia incluye las enzimas monooxigenasas citocromo P450 (Xianchun 2007) (Scott 1999) (Bergé 1998).

1. Mecanismos moleculares de resistencia por medio de citocromo P450. Se ha demostrado que el principal mecanismo de resistencia por citocromo P450 es un incremento en la expresión del gen. En la mayoría de los casos la sobreexpresión no se da por una duplicación de los genes. Hasta ahora se ha reportado solo duplicación de los genes CYP6P4 y CYP6P9 en *A. funestus*. (Wondji, 2009) Los mecanismos moleculares de resistencia por citocromo P450 son: Vía mutaciones en sitios trans-regulatorios, vía mutaciones en sitios cis-regulatorios y por cambios en la secuencia codificante.

a. Vía mutaciones en sitios trans-regulatorios. La sobreexpresión de los genes se debe a regulación vía mutaciones en loci trans-regulatorios. A pesar que la sobreexpresión se puede deber a un incremento en la transcripción, estabilidad del mRNA y traducción de la proteína; en la mayoría de los casos el incremento se debe a la activación por mutaciones e inserciones/delecciones en promotores que actúan en cis o en locus regulatorios trans. En *M. domestica* los alelos de CYP6A1 (en el cromosoma 5) y CYP6D1 (en el cromosoma 1) en la cepa resistente “Rutgers”, son regulados por factores del cromosoma 2 proveniente de la cepa susceptible. Esto produce una reducción en la expresión de estos dos genes a niveles similares a los de la cepa susceptible, cuando, en el cruce las dos copias del cromosoma 2 provienen de la cepa susceptible. Esto sugiere que la sobreexpresión de CYP6A1 y CYP6D1 se debe en parte a mutaciones que causan una pérdida en la función en el locus regulador en el cromosoma 2 de la cepa resistente (Xianchun 2007) (Hemingway 2004).

En *D. melanogaster* resistente a DDT, los genes CYP6A2 y CYP6A8 (en el cromosoma 2) son regulados por el loci represor en el cromosoma 3. En este caso también se sugiere que la resistencia se debe a una mutación que causa la pérdida de función del sitio represor (Xianchun 2007) (Hemingway 2004).

b. Vía mutaciones en sitios cis-regulatorios. Otro mecanismo de resistencia por citocromo P450 se debe a regulación vía mutaciones en loci cis-regulatorios. En los CYP6D1, CYP6D3 y CYP6A8 de *M. domestica* se encontraron mutaciones e inserciones/delecciones en el promotor lo cual puede contribuir a la sobreexpresión de estos genes (Xianchun 2007).

Los cambios en loci cis-regulatorios más importantes, son los encontrados en *D. melanogaster* y *D. simulans*. En *D. melanogaster* resistente a DDT el cambio se encuentra en la región 5' del promotor del gen CYP6G1. En esta el retrotransposon llamado *Accord* está insertado a 300pb antes del sitio de inicio de la transcripción. Varios estudios han demostrado que esta inserción *Accord* se relaciona con la resistencia a DDT e imidacloprid. En *D.*

simulans el retrotransposón que se inserta es llamado *Doc*. Este se inserta 200pb antes del sitio de inicio de la transcripción en el homólogo de CYP6G1 (Xianchun 2007).

Estas inserciones pueden tener diferentes efectos en la resistencia. Pueden introducir elementos aumentadores, alterar el sitio de represión, alterar la distancia física entre el sitio regulatorio y el de inicio de transcripción (Xianchun 2007).

c. Por cambios en la secuencia codificante. La pérdida de parte de la resistencia cuando los citocromos P450 no están sobreexpresados en *D. melanogaster*, sugiere que las mutaciones puntuales pueden cumplir un papel secundario en la resistencia mediada por P450 (Xianchun 2007).

Así mismo, se han observado mutaciones en el gen CYP6A2 en el sitio activo de la enzima lo cual incrementa el metabolismo del DDT (Xianchun 2007).

L. Citocromos P450 implicados en resistencia en Anofelinos

En Anofelinos, se ha reportado resistencia a insecticidas por citocromo P450 en *A. gambiae*, *A. funestus* y *A. minimus*. En *A. gambiae* los genes reportados asociados a resistencia son: CYP6Z1, CYP6P3 y CYP6M2 (Amenya 2005) (Ranson 2002).

En *A. funestus* los genes asociados a resistencia son: CYP6P4, CYP6AA4 y CYP6P1. Los genes CYP6P4 y CYP6P9 se expresan hasta 25 a 51 veces más en la cepa resistente comparada con la susceptible (Wondji 2009).

En *A. minimus* los genes expresados son CYP6AA3, CYP6P7. El gen CYP6P7 se expresa de 2-4 veces más en la cepa resistente a deltametrina (Rodpradit 2005).

M. Citocromos P450 implicados en resistencia en diferentes insectos

Se ha reportado diferentes genes citocromo P450 implicados en resistencia a insecticidas en diferentes insectos. Por ejemplo en *D. melanogaster*, se ha reportado que el gen CYP6G1 se sobreexpresa en la cepa resistente. Se ha demostrado que solamente con la expresión de este gen se puede lograr la resistencia a DDT en *D. melanogaster* (Daborn, *et al.* 2002) (McCart 2008).

En *Musca domestica*, se han reportado una diferencia en la expresión de los genes CYP6A5, CYP6D1 y CYP6A5v2 en la cepa resistente a piretroides. Este último CYP se sobreexpresa constitutivamente en la cepa resistente. La parte donde se expresa en mayor cantidad es en los tejidos abdominales, en donde se localizan los órganos principales para la detoxificación (Zhu 2008).

En vectores de enfermedades como *Culex pipiens* y *Aedes aegypti*, también se ha reportado la sobreexpresión de citocromos P450 en cepas resistentes a insecticidas. (Shen 2003) (Strode 2008) En *Cx. Pipiens* se ha reportado genes de la familia CYP4 como CYP4H21, CYP4H22v1, CYP4J4v2, CYP4J6v1, y CYP4J6v2 que se expresan de 3.1-7.7 veces más en la cepa resistente comparado con la cepa susceptible (Shen 2003).

En otros insectos como *Heliothis virescens* el citocromo CYP9A1 se sobreexpresa en la cepa resistente (Rose 1997). En *Helicoverpa armigera* la detoxificación de insecticidas piretroides es a través del citocromo P450. Se han encontrado dos genes de citocromo P450 CYP9A12, CYP9A14 y CYP6B7 que se expresan de 433, 59 y 9.3 veces más en la cepa resistente que en la susceptible. (Yang, et. al. 2006) En *Bemisia tabaci* se encontraron 11 genes P450 implicados en la resistencia a imidacloprid, entre estos el CYP6CM1. (Karunker, et. al., 2008) En *Blattella germanica* el gen *CYP4G19* también se sobreexpresa en la cepa resistente (Wu 1998).

N. Bioinformática

La bioinformática es la aplicación de técnicas de cómputo para el manejo, almacenamiento y análisis de datos biológicos. Actualmente la bioinformática tiene una gran cantidad de aplicaciones, entre estas el estudio de familias de genes, que es lo que se hará en este trabajo. El análisis de familias de genes permite comparar secuencias de diferentes organismos y encontrar las secuencias conservadas, así como las relaciones evolutivas y tiempos divergencia (Madden, 2002).

En este trabajo, los programas de bioinformática a utilizar serán BLAST y ClustalW.

O. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

Algoritmo de comparación de secuencias. El programa encuentra las secuencias de ADN o proteína de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia que se está analizando (Madden 2002).

1. Estadística de los programas de bioinformática BLAST

a. Estadísticas de la comparación de secuencias globales. Se conoce muy poco sobre las comparaciones globales óptimas; esto debido a que los puntajes de un alineamiento global crecen proporcionalmente al tamaño de la secuencia a comparar, y pequeños cambios en el sistema de puntaje pueden producir alineamientos diferentes. Por lo que hay pocos métodos para conocer si un alineamiento es estadísticamente significativo. Un alineamiento óptimo, es el mejor alineamiento que se puede obtener utilizando ciertos parámetros; mientras que un alineamiento global es cuando se realizan alineamientos de la secuencia entera, de principio a fin (Pang *et.al.* 2005).

Uno de las formas de conocer si un alineamiento es estadísticamente significativo, es generar muchos pares de secuencias del tamaño y composición adecuada y calcular el puntaje óptimo para cada alineamiento. Por ende se puede expresar el alineamiento en términos de desviaciones estándar de la media. Sin embargo no se puede asumir una distribución normal y convertir el valor de Z en valor P, ya que se desconoce el comportamiento de las colas de la distribución de un alineamiento global. Lo único que se puede afirmar es que de 100 alineamientos al azar con un puntaje menor al alineamiento de interés, el valor P del alineamiento de interés, probablemente será menor a 0.01 (Madden 2002).

b. Estadística de la comparación de secuencias locales y de secuencias con espacios. Debido a que no se cuenta con métodos que demuestren que un alineamiento es estadísticamente significativo, el programa BLAST utiliza la estadística de un alineamiento local. Un alineamiento local sin espacios consiste en un par de segmentos de igual tamaño. La estadística de estos alineamientos se basa en los siguientes términos:

1) **Puntaje bruto (Raw Score, S).** Se calcula a partir de las sumas de los puntajes de las sustituciones y de espacios. Los puntajes de sustitución están dados por las matrices de sustitución PAM (Point Accepted Mutation) o BLOSUM (Blocks Substitution Matrix). Los puntajes de espacio se calculan como la suma de las penalidades que se dan en la puntuación por alinear un espacio G (gap), más la penalización por extender un espacio

preexistente L (largo). Para un espacio de largo n , el valor del espacio será $G+Ln$. Los valores de G normalmente se encuentran entre 10-15 y los de L entre 1-2. Estos valores se escogen empíricamente (Madden 2002).

2) **Radio Lambda (S')**. Es el puntaje S normalizado. Se utiliza la ecuación 1. En donde λ y K son parámetros dependientes del sistema de puntaje, es decir la matriz de sustitución y los costos por los espacios. El radio de λ es el radio para un sistema dado de puntaje en el cual se usa la misma matriz de sustitución, pero costos de espacios infinitos. Este radio indica que proporción de la información, en un alineamiento sin espacios, debe ser sacrificada para mejorar el puntaje por medio de la extensión de espacios. Se ha determinado empíricamente que los costos de espacios tienden a unos radios de λ de 0.8-0.9 (Madden, 2002).

———— (Ecuación 1)

3) **Valor $-E$** . Es el número de diferentes alineamientos con puntajes equivalentes a o mejores que el valor S que se esperan que ocurran por azar en una búsqueda en base de datos. Es decir, entre menor sea el valor- E , más significativo será el puntaje. Se calcula con la ecuación 2 en donde m y n son el largo de la secuencias a comparar (Madden 2002).

(Ecuación 2)

4) **Identidades**: Segmento en donde dos aminoácidos o nucleótidos son iguales o invariantes (Madden 2002).

5) **Espacios**: Es un espacio introducido en un alineamiento para compensar las inserciones y deleciones en una secuencia comparado con otra. La introducción de un espacio causa la sustracción de un valor fijado (el gap score) del puntaje del alineamiento (Madden 2002).

c. **Estadística del alineamiento con bases de datos**. Ese alineamiento involucra compara una secuencia de largo m con una base de datos. En este alineamiento también se analiza el valor- E . En este caso, el valor- E se debe multiplicar por N/n en donde N es el largo

total de la base de datos en residuos, y n es el largo de la secuencia obtenida de la base de datos (Madden 2002).

Para determinar si el alineamiento que se produjo en BLAST es significativo o no, el programa proporciona valores como el valor-E y el Puntaje normalizado (EMBL-EB 2009).

El puntaje normalizado o puntaje máximo indica que tan bueno es el alineamiento que se produjo, entre más alto sea el valor mejor será el alineamiento producido. Este puntaje es calculado con la ecuación 1 (Madden 2002).

P. ClustalW

Es un programa para realizar alineaciones múltiples de secuencias de ADN o proteína. Calcula la mejor identidad entre secuencias y las alinea para representarlas gráficamente (EMBL-EB 2009).

1. Estadística de los programas de bioinformática ClustalW.

a. Matrices de sustitución. Una matriz de sustitución contiene valores proporcionales a la probabilidad que el aminoácido i mute al aminoácido j . Estas matrices son construidas con una muestra grande y diversa de alineamientos verificados. Si la muestra es lo suficientemente grande para que sea estadísticamente significativa, las matrices resultantes deberán reflejar las verdaderas probabilidades de que ocurran ciertas mutaciones en un período de evolución (Madden 2002).

Se les asigna un valor positivo a las identidades; las mutaciones observadas frecuentemente se les da una puntuación positiva, mientras que las poco observadas una puntuación negativa (Madden 2002).

Hay cuatro tipos de matrices: PAM, BLOSUM, GONNET y DNA Identity Matrix (EMBL-EB, 2009).

Las matrices PAM se basan en la distancia evolutiva entre pares de secuencias. Una unidad de 1.0PAM representa el 1% de cambios evolutivos que se producirá, en promedio, en los aminoácidos de una proteína. Una matriz PAM(x) es una tabla en donde los puntajes para cada sustitución de aminoácidos se han calculado; basándose en la frecuencia que se encontró

en proteínas altamente relacionadas que han experimentado una cantidad (x) de evolución divergente (Madden 2002).

La matriz PAM40 es la más sensible. La PAM250 es para secuencias más distantes. Para comparación de secuencias de nucleótidos se puede modificar la matriz PAM40 para que reconozca identidades y desigualdades; en este tipo de matrices se permite el cambio de una purina por otra purina, y una pirimidina por otra (EMBL-EB 2009).

BLOSUM es la más utilizada. En este tipo de matrices los puntajes para cada posición son obtenidos a partir de observaciones de las frecuencias de sustitución en bloques de alineamientos de proteínas relacionadas. Cada matriz es construida para una distancia evolutiva específica. Por ejemplo para construir la matriz BLOSUM62 se utilizaron secuencias que compartieran no más del 62% de identidad (Madden 2002).

Éstas son ideales para tratar de identificar una secuencia de nucleótidos desconocida (EMBL-EB 2009).

La matriz GONNET fue construida a partir de la medición de distancias para estimar el alineamiento de proteínas y a partir de esto crear una matriz. Los autores de esta matriz, encontraron que la distancia en las matrices como PAM250 difería dependiendo si se habían construido a partir de proteínas homólogas o distantes (EMBL-EB 2009).

En la matriz de DNA Identity matrix, se obtiene un puntaje positivo para una igualdad y un puntaje de -10000 para una desigualdad. Debido a que las desigualdades tienen una alta penalidad, no se permiten sustituciones pero sí espacios (EMBL-EB 2009).

El programa ClustalW además de utilizar las matrices de sustitución utiliza el Cuadro 2 para determinar si un cambio en los residuos mantiene la región conservada o no. Por ejemplo, si un residuo es A y cambia a F la región sigue siendo conservada debido a que el cambio fue de un residuo pequeño e hidrofóbico, por otro igual. Las regiones en donde los residuos o los nucleótidos son idénticos en toda la secuencia, se denota con un asterisco “*”; dos puntos “:” significa que ha habido una sustitución de acuerdo con el Cuadro 2, y el punto “.” significa que es una sustitución semi-conservativa (EMBL-EB 2009).

Cuadro 2. Clasificación de los aminoácidos por sus características químicas (EMBL-EB 2009).

Aminoácidos	Característica
AVFPMILW	Pequeños e hidrofóbicos
DE	Ácidos
RK	Básicos
STYHCNGQ	Hidroxilos-amino y básicos

III. JUSTIFICACIÓN

En el 2003 se dieron aproximadamente 30,000 casos registrados de malaria. Ésta es tratada con medicamentos como cloroquina y primaquina; sin embargo, se ha reportado resistencia del parásito contra estos medicamentos. Debido a esto, es importante encontrar formas alternativas para combatir la malaria, siendo una de las alternativas el control de vectores con el uso de insecticidas (Korenromp, *et.al.* 2005) (Sina 2002).

El uso extendido de insecticidas en Guatemala, ha producido que *A. albimanus* sea resistente a insecticidas organofosforados, piretroides y carbamatos (Brogdon 1992) (Beach 1989) (Beach, 1989)(Cordón-Rosales 1990). Por lo que es importante entender los mecanismos por los cuales se da la resistencia a insecticidas. Uno de estos mecanismos es la detoxificación por medio de enzimas citocromo P450 (Hemingway 2000). Actualmente, solo se cuenta con partes de la secuencia de 17 CYP de la familia 4 de una cepa de *A. albimanus* resistente a deltametrina (Scott 1994). Este estudio, permitió validar iniciadores para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9. Actualmente no se cuenta con ninguna secuencia para estas familias en *A. albimanus*. Los iniciadores de cada familia se validaron a partir de iniciadores degenerados publicados diseñados con base a regiones conservadas en diferentes especies de insectos. Este trabajo demostró que los iniciadores específicos propuestos para *A. gambiae* y *A. funestus* no amplificarán genes homólogos en *A. albimanus*, ya que los iniciadores son específicos para el CYP y la especie.

En un futuro, se espera que el uso de estos iniciadores permitan obtener secuencias de los genes de las familias CYP6 y CYP9 para diseñar iniciadores específicos que permitan detectar los diferentes genes implicados en la resistencia a insecticidas en una cepa resistente de *A. albimanus*. A largo plazo, también se podrán desarrollar métodos de monitoreo de resistencia en el campo basados en esta nueva información.

IV. OBJETIVOS

A. General

1. Validar *in silico* iniciadores reportados en la literatura para la amplificación del ARNm de genes de las familias CYP6 y CYP9 del citocromo P450 en *Anopheles albimanus*.

B. Específicos

1. Validar *in silico* iniciadores para la amplificación de familias de genes del citocromo P450 CYP6 y CYP9 implicados en la resistencia a insecticidas en otros insectos, utilizando como modelo *A. albimanus*.
2. Validar *in silico* iniciadores para los genes CYP6P9, CYP6P4, CYP6AA4, CYP6M2 y CYP6P3 implicados en la resistencia a insecticidas en *A. funestus* y *A. gambiae* y determinar si se pueden utilizar para amplificar genes en *A. albimanus*

V. MÉTODOS

A. Procedimiento

El objetivo de este trabajo fue la validación *in silico* de iniciadores para la identificación de genes citocromo P450 en *Anopheles albimanus*. Se validaron los iniciadores reportados en Wondji 2009; Muller, *et.al.* 2008 y Ameyna, *et.al.* 2005.

Se utilizaron dos planteamientos para validar los dos tipos iniciadores: degenerados y específicos. Para los degenerados se partió de iniciadores degenerados diseñados en base a regiones conservadas se buscó fue determinar si estos iniciadores generales podrían amplificar genes en una especie específica como *A. albimanus*. El acercamiento utilizado para validar los iniciadores específicos consistió en determinar si un iniciador específico para un gen de una especie se podía utilizar de manera general para amplificar genes homólogos en diferentes Anofelinos.

Los iniciadores degenerados fueron diseñados de acuerdo a las secuencias conservadas de las citocromas P450. Las regiones conservadas utilizadas fueron: para CYP6 la región YELN y la región de unión al grupo hem; para CYP9 la región conservada de la hélice I FTGS y la región ETLR en CYP9. Para determinar si los iniciadores amplificarían genes de la familia del citocromo P450, se realizaron alineamientos de diferentes secuencias de proteínas de las familias CYP6 y CYP9 de *A. gambiae*, *A. funestus* y otros insectos como *D. melanogaster*, *C. quinquefasciatus*, *M. domestica*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa armigera*. Esto permitió determinar si las regiones utilizadas para diseñar los iniciadores son realmente conservadas en los diferentes insectos, y por lo tanto pueden amplificar genes citocromo P450 en *A. albimanus*. Se comparó con otros insectos debido a que las secuencias disponibles de citocromos P450 eran de *A. funestus* y *A.gambiae*, los cuales están cercanos filogenéticamente entre sí, pero alejados de *A. albimanus*. Utilizar otros insectos permitió conocer si las regiones estaban conservadas y, por lo tanto, estarían conservadas también en *A. albimanus*, dando confiabilidad a los resultados obtenidos.

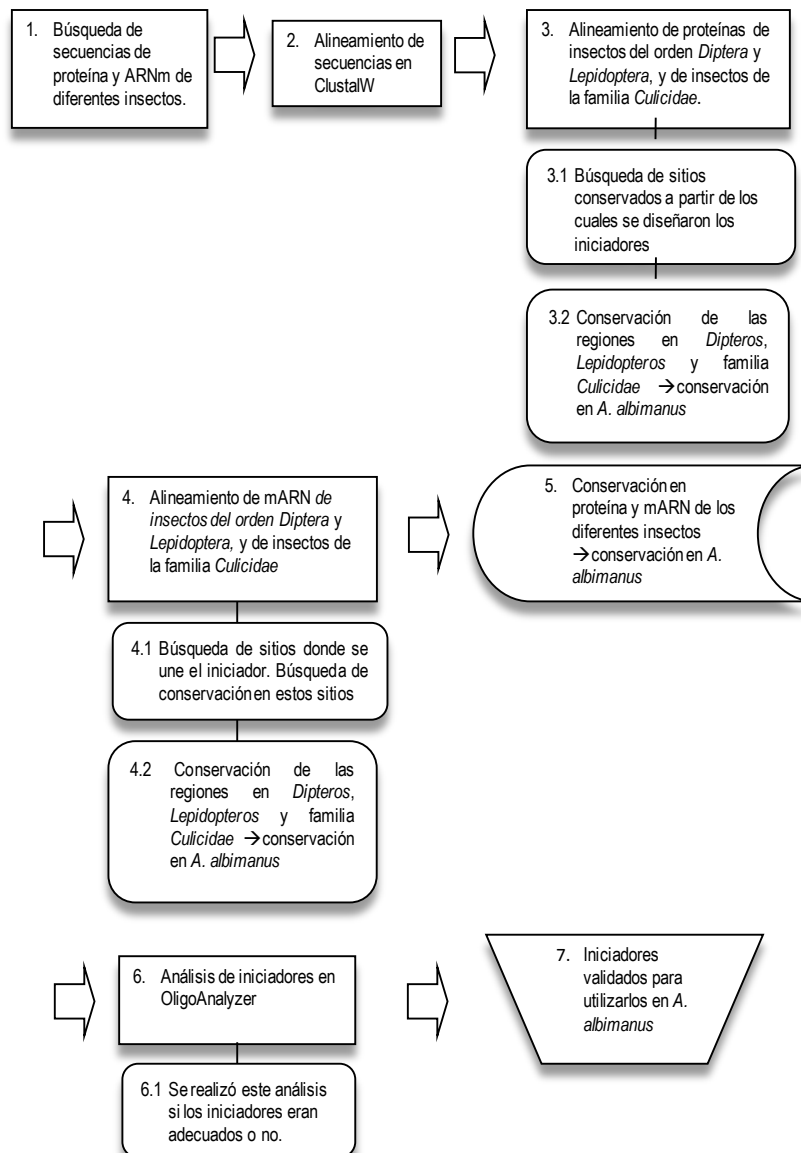
Para la validación de iniciadores de CYP6P9, CYP6P4, CYP6AA4, CYP6P3, CYP6M2 se realizaron alineamientos de las secuencias de iniciadores con la base de datos de Anofelinos de BLAST; esto con el fin de determinar si los iniciadores específicos podrían amplificar homólogos de CYP6 en otras especies de Anofelinos además de la que son específicos. Si los iniciadores mostraban un alineamiento con otro CYP6 de otro anophelino,

estos iniciadores podrían amplificar los homólogos de estos genes en *A. albimanus*. El valor-E y el puntaje máximo fueron los valores para determinar si el alineamiento en BLAST es significativo.

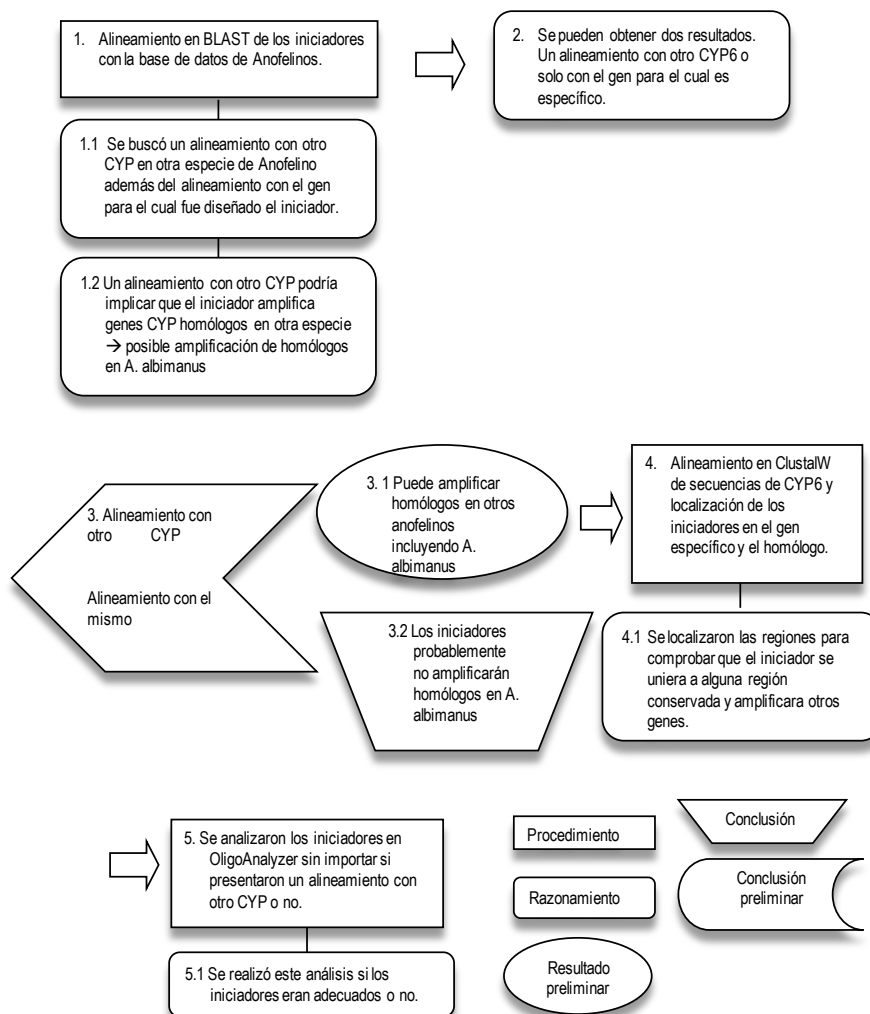
En la figura 13 se observa un diagrama de flujo del proceso para la validación de los iniciadores degenerados (A) y específicos (B)

Figura 13. Diagrama de flujo del procedimiento para la validación in silicio de iniciadores

A) Validación de iniciadores degenerados publicados en Amenya *et al.* (2005)



B) Validación de iniciadores específicos publicados en



1. Búsqueda de secuencias. Se realizó una búsqueda de las secuencias de proteínas y nucleótidos de citocromo P450 implicadas en la resistencia en diferentes dípteros como: *Drosophila melanogaster*, *Culex quinquefasciatus*, *Musca domestica*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, *Anopheles minimus*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa armigera*.

Las búsquedas se realizarán en NCBI con la base de datos de proteínas y de nucleótidos (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide y www.ncbi.nlm.nih.gov/protein).

En el Cuadro 3 y 4 se muestran las secuencias de proteína y mRNA obtenidas de NCBI.

Cuadro 3. Secuencias de proteínas obtenidas de NCBI

Gen CYP	Número de accesión	Insecto
CYP6P1	AA Y85596.1	<i>Anopheles funestus</i>
CYP6P9	AA V68097.2	
CYP6P5	AAZ04292.1	
CYP6P4	AA Y85603.1	
CYP6Y1	AA Y85604.1	
CYP6N2	AA Y85601.1	
CYP6M1	AA Y85600.1	
CYP6M8	AA V68096.1	
CYP6M7	AA V68095.1	
CYP6AA4	AAL93295.1	
CYP6P3	AAL93295.1	<i>Anopheles gambiae</i>
CYP6Z1	AAL93296.1	
CYP6P2	AAL93298.1	
CYP6P7	AAN05727.1	<i>Anopheles minimus</i>
CYP6F1	BAA92152.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CYP6G1	AAF58557.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
CYP6A2	AAB36782.1	
CYP6A8	AAF58185.2	
CYP6D1	AAC99341.1	<i>Musca domestica</i>
CYP9L4	AA Y85606.1	<i>Anopheles funestus</i>
CYP9M3	AA V68102.1	
CYP9J14	AA V68101.1	
CYP9J13	AA V68100.1	
CYP9J12	AA V68099.1	
CYP9K1	AAR13731.1	<i>Anopheles gambiae</i>
CYP9L1	AAL96668.1	
CYP9C1	XP_001869970.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CYP9B2	XP_001864297.1	
CYP9B1	XP_001855241.1	
CYP9J1	AAK73350.1	<i>Aedes aegypti</i>
CYP9J2	AAK17188.1	
CYP9B1	NP_523645.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
CYP9C1	NP_523850.1	
CYP9B2	AAF59290.1	
CYP9A1v2	AAD25104.1	<i>Heliothis virescens</i>

Cuadro 4. Secuencias de proteínas obtenidas de NCBI

Gen CYP	Número de accesoión	Insecto
CYP6P9	DQ497428.1	<i>Anopheles funestus</i>
CYP6M8	AY729660.1	
CYP6M7	AY729659.1	
CYP6AA4	AY729658.1	
CYP6P3	AF487534.1	<i>Anopheles gambiae</i>
CYP6Z1	AF487535.1	
CYP6P2	AF487537.1	
CYP6M1	AY062208.1	
CYP6P7	AY426719.1	<i>Anopheles minimus</i>
CYP6G1	NM_136899.2	<i>Drosophila melanogaster</i>
CYP6A2	NM_078904.1	
CYP6A8	NM_079025.3	
CYP6D1	U22366.1	<i>Musca domestica</i>
CYP6B7	DQ497428.1	<i>Helicoverpa armigera</i>
CYP9M3	AY729666.1	<i>Anopheles funestus</i>
CYP9J14	AY729665.1	
CYP9J13	AY729664.1	
CYP9J12	AY729663.1	
CYP9J11	AY729662.1	
CYP9K1	AF487533.1	<i>Anopheles gambiae</i>
CYP9L1	XM_320243.3	
CYP9C1	XM_001869935.1	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CYP9B2	XM_001864262.1	
CYP9J1	AF390099.1	<i>Aedes aegypti</i>
CYP9J2	AF329892.1	
CYP9H1	NM_136976.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
CYP9C1	NM_079126.2	
CYP9B1	NM_078921.2	
CYP9A1V2	AF140021.1	<i>Heliothis virescens</i>

2. Identificación de iniciadores a validar. Los iniciadores degenerados a validar para amplificar genes de las familias CYP6 y CYP9 se muestran en el Cuadro 2, y los iniciadores específicos en el Cuadro 3.

Cuadro 5. Iniciadores generales para las familias CYP6 y CYP9 (Amenya, et.al. 2005).

Familia	Iniciador forward	Iniciador reverse
CYP6	5'-TCW SIC TGT ACGAGC TKG C-3'	5'-GGI CCC TCG CCGAACGG-3'
CYP9	5'-TTYACCGGC AGC AAR ATG CG-3'	5'-AGY GTYTCC GAY ACR ACC ATR TC-3'

En el Cuadro 2 los nucleótidos degenerados: W puede ser A/T, S puede ser C/G, K puede ser G/T, Y puede ser C/T y R puede ser G/A (NC-IUB 2008).

Cuadro 6. Iniciadores específicos (Wondji 2009) (Muller, et.al. 2008)

Gen	Iniciador forward	Iniciador reverse	Especie para la que es específico	Homólogo
CYP6P9	5'- AGGTGACACTATAGAATATCTT CGTAGTGTCCGGCAGTG -3'	5'- GTACGACTCACTATAGGGACCG AACAGAAAATGTGGGT-3'	<i>A. funestus</i>	CYP6P3 de <i>A. gambiae</i>
CYP6P4	AGGTGACACTATAGAATAGAGG ACCATGGTGGACAAGT	GTACGACTCACTATAGGGACTG GGTAAAACCTCGGGATCA	<i>A. funestus</i>	CYP6P4 de <i>A. gambiae</i>
CYP6AA4	AGGTGACACTATAGAATATCCC GGTCGGTAATATGAAA	GTACGACTCACTATAGGGACAC CGGCTTAAGCATGAAGT	<i>A. funestus</i>	CYP6AA1 <i>A. gambiae</i>
CYP6P3	AGCTAATTAACGCGGTGCTG	AAGTGTGGATTCCGAGCGTA	<i>A. gambiae</i>	CYP6P9 <i>A. funestus</i>
CYP6P1	AGGTGACACTATAGAATACCCG CGTAATGTAGGAGTTC	GTACGACTCACTATAGGGAAC CCTCAGCTGAAAACCGA	<i>A. funestus</i>	CYP6P1 <i>A. gambiae</i>
CYP6M2	TTCGTCGACTCTCTCACCT	GAAATGTACCGGGACTGGTG	<i>A. gambiae</i>	CYP6M8 <i>A. funestus</i>

3. Alineamiento de secuencias. Se llevó a cabo una alineación de las secuencias de proteína y nucleótidos de citocromo P450 de los diferentes dípteros en ClustalW.

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Para los iniciadores específicos además de los programas anteriores se utilizó BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de nucleótidos.

Cuadro 7. Parámetros a utilizar en BLAST en los alineamientos

Parámetros	Valores
Umbral esperado	10
Puntaje de identidad/desigualdad	1,-2
Costos de espacios	Lineal

a. Umbral esperado Este parámetro especifica el umbral de los valores de significancia estadística que se aceptarán para identidades. El valor escogido es 10, lo cual significa que si el valor-E es mayor que el umbral esperado, la identidad encontrada no será significativa; mientras que si el valor-E es menor que el umbral, sí será significativo (Madden 2002).

b. Puntaje de identidad/ desigualdad. Se refiere a un puntaje positivo que se da por una identidad y una penalidad por una desigualdad. La proporción de identidad/desigualdad debe aumentar mientras más divergentes sean las secuencias comparadas. Un radio de 0.33 (1/-3) es para secuencias que son 99% conservadas; un radio de 0.5 (1/-2) es para secuencias 95% conservadas, y un radio de (1/-1) para secuencias 75% conservadas (Madden 2002)

c. Costos de espacios. Es el costo de abrir o extender un espacio en un alineamiento. En este caso se escogerá un costo lineal que es el valor para megablast y es determinado por los puntajes de identidad/desigualdad (Madden 2002).

Cuadro 8. Parámetros del alineamiento para ClustalW en los alineamientos

Parámetros	Valores (Proteína/ADN)
Penalidad por abertura de espacio	10/ 15.0
Penalidad por la extensión de un espacio	0.2/6.66
Matriz de sustitución	BLOSSUM/DNA Identity matrix

d. Penalidad por abertura y extensión de un espacio Es la penalidad que tendrá abrir o extender un espacio en un alineamiento (Madden 2002).

4. Análisis de los iniciadores Se realizó un análisis de cada iniciador para determinar si formaría estructuras de lazo, dímeros con el mismo o con el otro iniciador, la diferencia de T_m , etc.

Se utilizó el programa Oligo Analyzer de SciTools

(<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>)

Cuadro 9. Parámetros para el análisis de los iniciadores en SciTools

Parámetros	Valores
Concentración de Na^+	50mM
Concentración de dNTPs y Mg^{++}	0.0mM
Concentración del iniciador	0.25uM

5. Análisis de datos. Para el análisis de los iniciadores de las familias CYP6 y CYP9 en ClustalW se analizaron los segmentos de las secuencias conservadas utilizadas para diseño de los iniciadores degenerados. Es decir las que tienen los símbolos “*”, “.” y “.”(EMBL-EB, 2009). Los alineamientos para esta sección se hicieron con secuencias de proteínas y de nucleótidos (mARN).

Como parte de este análisis se utilizaron secuencias de insectos de diferente orden (Diptera y Lepidoptera) de la familia Culicidae y diferentes especies de Anofelinos. Se utilizaron estas secuencias ya que al conocer la relación filogenética que existe entre los diferentes insectos se podría determinar si la secuencia sería conservada en insectos del mismo orden, familia pero de diferente especie como *A. albimanus*.

Para el análisis de los iniciadores específicos en BLAST se tomaron en cuenta el Valor-E, Puntaje máximo e Identidades de los homologos de CYP en otros Anofelinos que mostro el alineamiento. Se tomo como significativo, el alineamiento con valor-E menor a 2. El puntaje máximo debió ser mayor a 30 bits, y el porcentaje de identidades mayor a 75%.

Se realizaron alineamientos en ClustalW de secuencias de genes de la familia CYP6 de varios insectos, y se observo donde se une el iniciador. Esto permitió determinar si el

iniciador se unirá o no a regiones conservadas. Ya que si se une a regiones conservadas no será tan específico para el gen blanco.

También se analizaron las estructuras de cada primer como la formación de dímeros con el mismo, la formación de lazo, el ΔG , diferencia de T_m . Se aceptará una diferencia en el $T_m = 3^\circ\text{C}$ y un ΔG menor a -3kcal/mol para la formación de lazo y dímeros ΔG menor a -6Kcal/mol . Un porcentaje de CG de 40-70% (Premier Biosoft International, 2009).

VI. RESULTADOS

A. Resultados del análisis de los iniciadores degenerados

1. Análisis en ClustalW de iniciadores degenerados. Las figuras con los alineamientos muestran solamente la región donde se unen los iniciadores y no el alineamiento completo. Los alineamientos completos se encuentran en la sección de Anexos.

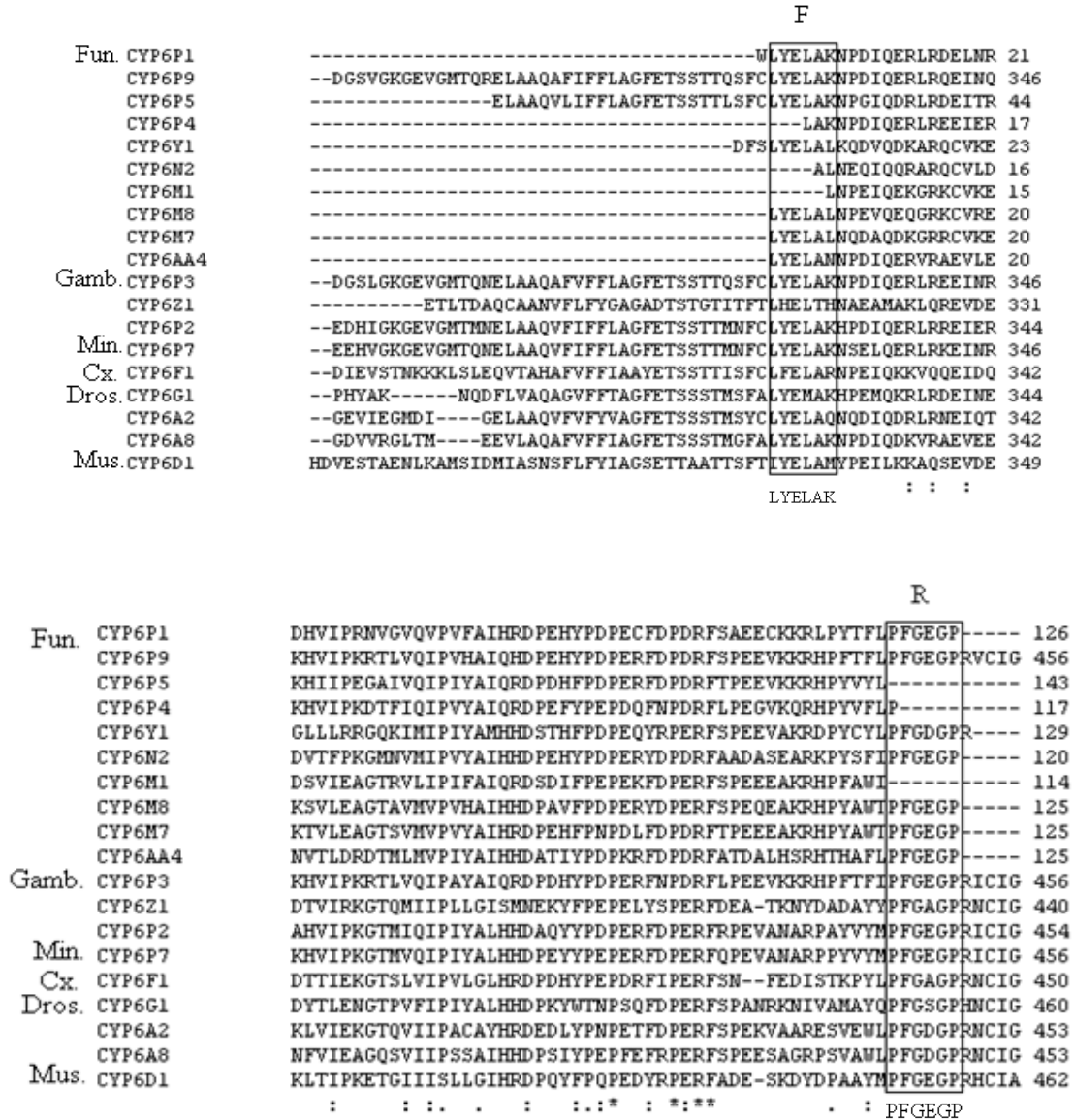
Las secuencias de proteínas de genes de CYP6 de Dípteros se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el Cuadro 10 y la alineación se muestra en la Figura 14.

Cuadro 10. Secuencias de proteínas de la familia CYP6 de insectos utilizados para el alineamiento de la Figura 14

Gen CYP6	Insecto	Abreviatura utilizada en la figura
CYP6P1	<i>Anopheles funestus</i>	Fun
CYP6P9		
CYP6P5		
CYP6P4		
CYP6Y1		
CYP6N2		
CYP6M1		
CYP6M8		
CYP6M7		
CYP6AA4		
CYP6P3	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP6Z1		
CYP6P2		
CYP6P7	<i>Anopheles minimus</i>	Min.
CYP6F1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cx.
CYP6G1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dros.
CYP6A2		
CYP6A8		
CYP6D1	<i>Musca doméstica</i>	Mus

Figura 14. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento.



Las secuencias de proteínas de genes de CYP6 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el cuadro 11 y la alineación se muestra en la Figura 15.

Cuadro 11. Secuencias de proteínas de la familia CYP6 utilizadas para el alineamiento de la Figura 15

Gen CYP6	Insecto	Abreviatura utilizada en la figura
CYP6P1	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP6P9		
CYP6P5		
CYP6P4		
CYP6Y1		
CYP6N2		
CYP6M1		
CYP6M8		
CYP6M7		
CYP6AA4		
CYP6P3	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP6Z1		
CYP6P2		
CYP6P7	<i>Anopheles minimus</i>	Min.
CYP6F1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cx.

Figura 15. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de insectos de la familia *Culicidae*.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento

	F	
Fun. CYP6P1	-----M [□] LYELAK [□] NPDIQERLRDELNR [□] AIETNDGELT 31	
CYP6P9	--MTQRELAQAQIFFLAGFETSSTTQSFCLYELAK [□] NPDIQERLRQEI [□] INQAIENDGGQVT 356	
CYP6P5	-----ELAAQVLIFFLAGFETSSTTLSFCLYELAK [□] NPDIQERLRDEI [□] TRAIDDNGGEVT 54	
CYP6P4	-----LAK [□] NPDIQERLRREEIERGVEDHGGQVT 27	
CYP6Y1	-----DFS [□] LYELAL [□] KQDVQDKARQCVK [□] ETLQKYGGKLS 33	
CYP6N2	-----ALNEQIQRRARQCVLD [□] AVK [□] KG-GLS 25	
CYP6M1	-----LNPEIQEKGRKCVKEI [□] LEKRN [□] GEMT 25	
CYP6M8	-----LYELAL [□] NPEVQEQGRKCVRE [□] VLKKHNGEMS 30	
CYP6M7	-----LYELAL [□] NQDAQDKGRRCVKE [□] VLE [□] RHNGELT 30	
CYP6AA4	-----LYELAN [□] NPDIQERVRAEVLE [□] KLK [□] LHDNQIT 30	
Gamb. CYP6P3	--MTQNELAAQAFVFFLAGFETSSTTQSFCLYELAK [□] NPDIQERLREEIN [□] RAIANGGQVT 356	
CYP6Z1	ETLTDAAQCAANVFLFYGAGADTSTGTTITFTL [□] HE [□] LTHNAEAMAKLQRE [□] VDE [□] MMERHHGEIT 341	
CYP6P2	--MTMNELAAQVFIFFLAGFETSSTT [□] MNFC [□] LYELAK [□] NPDIQERLRREIERAVE [□] ENGELT 354	
Min. CYP6P7	--MTQNELAAQVFIFFLAGFETSSTT [□] MNFC [□] LYELAK [□] NSELQERLRKEIN [□] RAIANGGELT 356	
Cx. CYP6F1	KKLSLEQVTAHAFVFFIAAYETSSTTISFC [□] LYELAN [□] PEIQK [□] VQ [□] QEI [□] DQVLASHNGEIT 352	
	LYELAK : : : : :	
	R	
Fun. CYP6P1	PEHYDP [□] PEC [□] FD [□] PDF [□] RS [□] AEECK [□] R [□] LPY [□] TF [□] LP [□] FGEGP [□] ----- 126	
CYP6P9	PEHYDP [□] PER [□] FD [□] PDF [□] RS [□] P [□] EEV [□] K [□] R [□] HP [□] PT [□] FL [□] PFGE [□] PR [□] VCIG [□] LR [□] FG [□] VM [□] Q [□] TK [□] VGL [□] LIT [□] LLR [□] K [□] FR 476	
CYP6P5	PDHFPD [□] PER [□] FD [□] PDF [□] TP [□] EEV [□] K [□] R [□] HP [□] Y [□] VYL [□] ----- 143	
CYP6P4	PEFY [□] PD [□] Q [□] F [□] MP [□] DR [□] FL [□] PEG [□] V [□] K [□] R [□] HP [□] Y [□] VFL [□] P----- 117	
CYP6Y1	STHFPD [□] PE [□] Q [□] Y [□] R [□] PER [□] FS [□] PEE [□] V [□] AK [□] RD [□] PY [□] CYL [□] PF [□] GD [□] GR----- 129	
CYP6N2	PEHYDP [□] PER [□] YD [□] PDF [□] FA [□] AD [□] ASE [□] ARK [□] PY [□] S [□] FI [□] PFGE [□] P----- 120	
CYP6M1	SDIF [□] PE [□] PE [□] K [□] FD [□] PER [□] FS [□] PEE [□] E [□] AK [□] R [□] HP [□] FAM [□] I----- 114	
CYP6M8	PAVFPD [□] PER [□] YD [□] PER [□] FS [□] PEE [□] Q [□] AK [□] R [□] HP [□] Y [□] AM [□] TF [□] PFGE [□] P----- 125	
CYP6M7	PEHFPN [□] DL [□] FD [□] PDF [□] TP [□] EEE [□] AK [□] R [□] HP [□] Y [□] AM [□] TF [□] PFGE [□] P----- 125	
CYP6AA4	ATIY [□] PD [□] PK [□] RF [□] PDF [□] FAT [□] DAL [□] HSR [□] HT [□] HAL [□] TF [□] PFGE [□] P----- 125	
Gamb. CYP6P3	PDHY [□] PD [□] PER [□] FN [□] PDF [□] RL [□] PEE [□] V [□] K [□] R [□] HP [□] PT [□] FI [□] PFGE [□] PR [□] ICIG [□] LR [□] FG [□] LM [□] Q [□] TK [□] VGL [□] LIT [□] LLR [□] K [□] FR 476	
CYP6Z1	EKY [□] FPE [□] PE [□] LYS [□] PER [□] FDE [□] AT [□] K [□] MYD [□] -AD [□] AY [□] PF [□] GAG [□] PR [□] NCIG [□] LR [□] QG [□] LL [□] SKIAL [□] V [□] M [□] LS [□] RFN 460	
CYP6P2	AQYY [□] PD [□] PER [□] FD [□] PER [□] FR [□] PE [□] VAN [□] AR [□] PAY [□] VY [□] MP [□] FGEG [□] PR [□] ICIG [□] LR [□] FG [□] MM [□] Q [□] TK [□] VGL [□] LIT [□] LLR [□] Q [□] FR 474	
Min. CYP6P7	PEYY [□] PE [□] PER [□] FD [□] PER [□] FQ [□] PE [□] VAN [□] AR [□] PPY [□] VY [□] MP [□] FGEG [□] PR [□] ICIG [□] MR [□] FG [□] MM [□] Q [□] TK [□] VGL [□] LIT [□] LLR [□] Q [□] FR 476	
Cx. CYP6F1	PDHY [□] PE [□] PDF [□] RI [□] PER [□] FSN [□] --FED [□] IST [□] K [□] PYL [□] PF [□] GAG [□] PR [□] NCIG [□] LR [□] L [□] G [□] KL [□] Q [□] T [□] KAG [□] LV [□] M [□] LS [□] K [□] FN 470	
	:. :*:** . : PFGE [□] P	

Las secuencias de proteínas de genes de CYP6 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el Cuadro 8 y la alineación se muestra en la Figura 15.

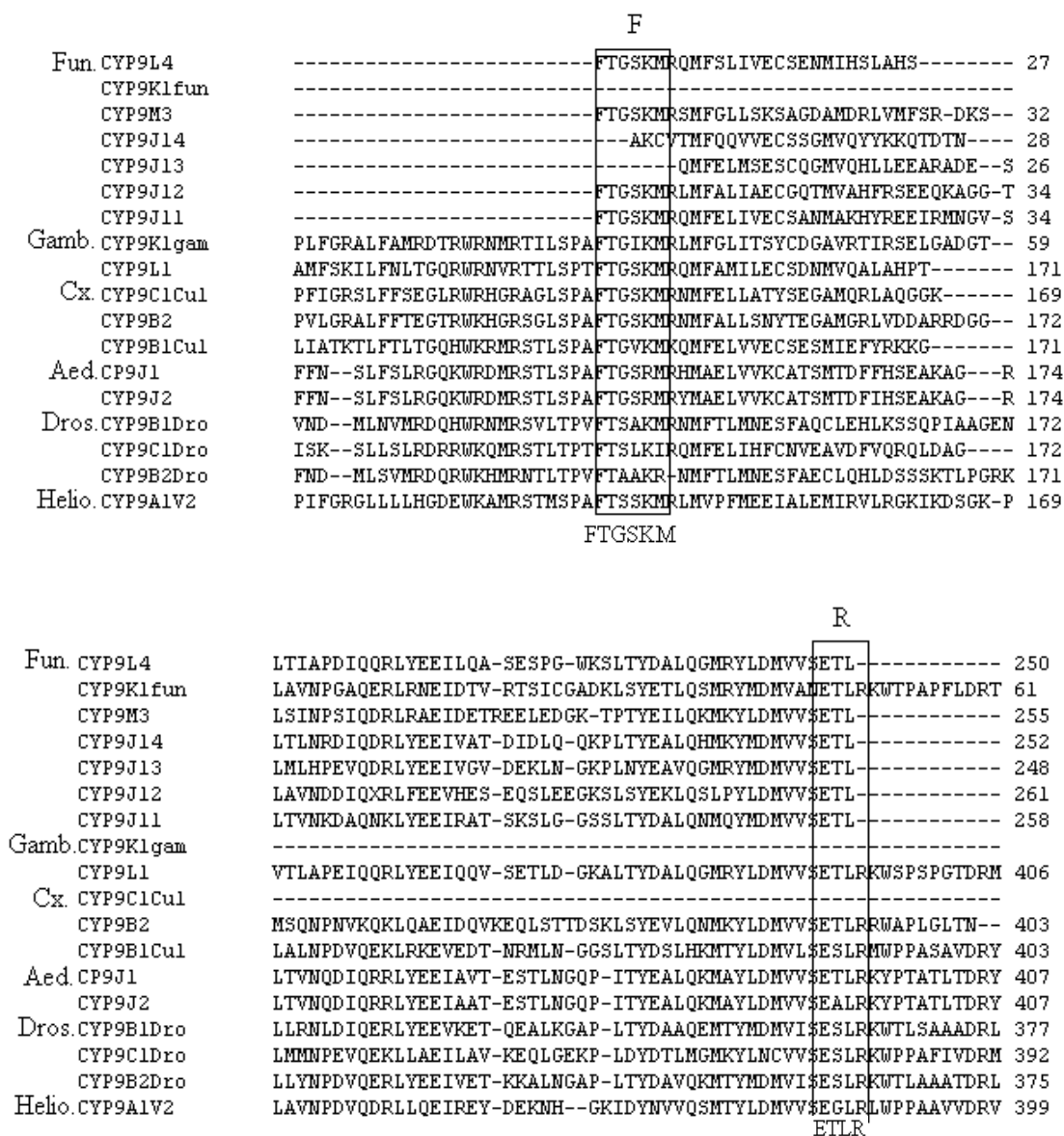
Las secuencias de proteínas de genes de CYP9 de insectos del superorden *Endopterygota* se alinearon para observar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el Cuadro 12 y la alineación se muestra en la Figura 16.

Cuadro 12. Secuencias de proteínas de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 16

CYP9	Insecto	Abreviaturas utilizada en la figura
CYP9L4	<i>Anopheles funestus</i>	<i>Fun.</i>
CYP9M3		
CYP9J14		
CYP9J13		
CYP9J12		
CYP9K1	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Gamb.</i>
CYP9L1		
CYP9C1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	<i>Cx</i>
CYP9B2		
CYP9B1		
CYP9J1	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aed.</i>
CYP9J2		
CYP9B1	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Dros.</i>
CYP9C1		
CYP9B2		
CYP9A1v2	<i>Heliothis virescens</i>	<i>Helio</i>

Figura 16. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento.



Las secuencias de proteínas de genes de CYP9 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el Cuadro 13 y la alineación se muestra en la Figura 17.

Cuadro 13. Secuencias de proteínas de la familia CYP9 utilizadas en el alineamiento de la Figura 17

CYP9	Insecto	Abreviatura utilizada en la figura
CYP9L4	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP9M3		
CYP9J14		
CYP9J13		
CYP9J12		
CYP9K1	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP9L1		
CYP9C1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cx.
CYP9B2		
CYP9B1		
CYP9J1	<i>Aedes aegypti</i>	Aed.
CYP9J2		

Figura 17. Alineamiento de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento

			R	
Fun.	CYP9L4	TIAPDIQQRLYEEILQASESPG--WKS [*] LT [*] YDALQGMRYLDMV [*] V\$ [*] ETL	-----	250
	CYP9M3	SINPSIQDRLR [*] AEIDETREELED-GKTPT [*] YEILQKMKYLD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	-----	255
	CYP9J14	TLNRDIQDRLYEEIVATDIDLQ--QKPLTYEALQHMKYMD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	-----	252
	CYP9J13	MLHPEVQDRLYEEIVGVDEKLN--GKPLN [*] YEAVQGMRYMD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	-----	248
	CYP9J12	AVMDDIQXRLFEEVHESEQSLEE-GKSLSYEKLQSLPYLD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	-----	261
	CYP9J11	TWNKDAQNKLYEEIRATSKSLG--GSSLTYDALQNMQYMD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	-----	258
Gamb.	CYP9K1	-----	-----	
	CYP9L1	TLAPEIQQRLYEEIQVSETLD--GKALTYDALQGMRYLDMV [*] V\$ [*] ETL	RKWS [*] PS [*] PG [*] TDRMC	407
Cx.	CYP9C1	-----	-----	
	CYP9B2	SQNPNVKQKLQAEIDQVKEQLST [*] DSKLSYEVLQNMKYLD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	RRWAPLGLTNRAC	406
	CYP9B1	ALNPDVQEKLRKEVEDTNRMLN--GSSLTYDSLHKMTYLD [*] MV [*] L\$ [*] ESL	HWPPASAVDRYC	404
Aed.	CP9J1	TWNQDIQQRLYEEIAVTESTLN--GQPITYEALQKMAYLD [*] MV [*] V\$ [*] ETL	RKYPTATLTDRYV	408
	CYP9J2	TWNQDIQQRLYEEIAATESTLN--GQPITYEALQKMAYLD [*] MV [*] V\$ [*] EA	LRKYPTATLTDRYA	408

ETLR

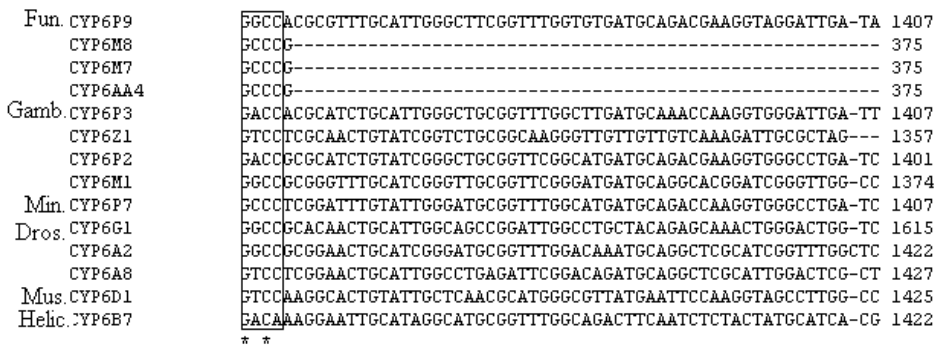
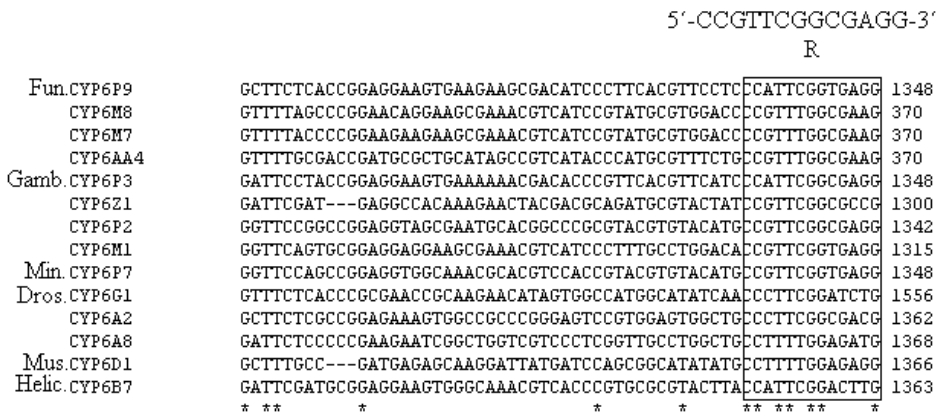
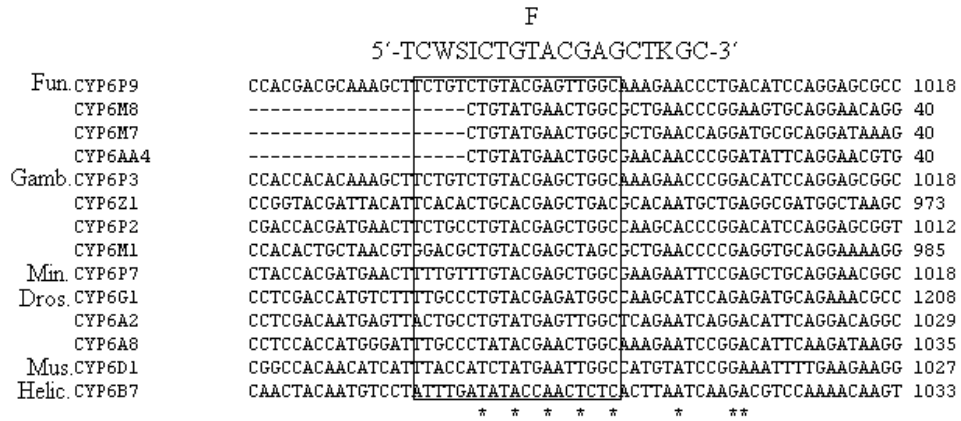
Las secuencias de mRNA de genes de CYP6 de Dipteros se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de mRNA utilizadas se detallan en el cuadro 14 y la alineación se muestra en la Figura 18.

Cuadro 14. Secuencias de mRNA de la familia CYP6 utilizados para el alineamiento de la Figura 18

Gen CYP6	Insecto	Abreviaturas utilizadas en la figura
CYP6P9	<i>Anopheles funestus</i>	<i>Fun.</i>
CYP6M8		
CYP6M7		
CYP6AA4		
CYP6P3	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Gamb.</i>
CYP6Z1		
CYP6P2		
CYP6M1		
CYP6P7	<i>Anopheles minimus</i>	<i>Min.</i>
CYP6G1	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Dros.</i>
CYP6A2		
CYP6A8		
CYP6D1	<i>Musca domestica</i>	<i>Mus.</i>
CYP6B7	<i>Helicoverpa armigera</i>	<i>Helico</i>

Figura 18. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP6 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. W:A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. F: iniciador forward. R: complemento reverse del iniciador reverse



R
5'-GICC-3'

Las secuencias de mRNA de genes de CYP6 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el Cuadro 15 y la alineación se muestra en la Figura 19. Para este alineamiento se utilizaron solamente secuencias de Anofelinos debido a que se contaba sólo con la secuencia de mRNA de estos y no de otros insectos de la familia *Culicidae*.

Cuadro 15. Secuencias de mRNA de la familia CYP6 utilizadas para el alineamiento de la Figura 19

CYP6	Insecto	Abreviaturas utilizadas en la figura
CYP6P9	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP6M8		
CYP6M7		
CYP6AA4		
CYP6P3	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP6Z1		
CYP6P2		
CYP6M1		
CYP6P7	<i>Anopheles minimus</i>	Min.

Figura 19. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP6 de insectos de la familia *Culicidae*.

Los nucleótidos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los nucleótidos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador Forward. R: complemento reverse del iniciador reverse W:A/T R:A/G Y: C/T S:C/G



Las secuencias de mRNA de genes de CYP9 de insectos del superorden *Endopterygota* se alinearon para observar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de mRNA utilizadas se detallan en el Cuadro 16 y la alineación se muestra en la Figura 20.

Cuadro 16. Secuencias de mRNA de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 20

Gen CYP9	Insecto	Abreviaturas utilizadas en la figura
CYP9M3	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP9J14		
CYP9J13		
CYP9J12		
CYP9J11		
CYP9K1	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP9L1		
CYP9C1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cx
CYP9B2		
CYP9J1	<i>Aedes aegypti</i>	Aed.
CYP9J2		
CYP9H1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dros.
CYP9C1		
CYP9B1		
CYP9A1V2	<i>Heliothis virescens</i>	Helio.

Figura 20. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP9 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. W: A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. F: iniciador forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento.

F 5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'

Fun. CYP9M3	--TTACCGGCAGCAAAATGCC	TAGC-ATGTTTGGCCTGCTGAG-----	CAAAAGCGC	50
CYP9J14	-----GCGAAATGCC	TGACCATGTTTCAGCAGGTGGT-----	GGAATGCAG	41
CYP9J13	-----	CAG--ATGTTTGAAGTGTGAG-----	CGAAAGCTG	29
CYP9J12	--TTACCGGCAGCAAAATGCC	TCTG-ATGTTTGGCCTGATTGC-----	GGAATGCCG	50
CYP9J11	--TTACCGGCAGCAAAATGCC	TCAG-ATGTTTGAAGTGTGAG-----	GGAATGCAG	50
Gamb.CYP9K1	CTTTACCGGCAGCAAGATGCC	GCTA-ATGTTCCGGCTGATCAC-----	GAGTACTG	488
CYP9L1	CGTTACCGGCAGCAAGATGCC	CCAG-ATGTTCCGCATGATCTT-----	GGAGTGCAG	479
Cx.CYP9C1Cul	CGTTACCGGCAGCAAGATGCC	GAAC-ATGTTCCGAGCTGTGGC-----	GACGTACAG	470
CYP9B2Cul	CTTTACCGGTAGCAAAATGAG	AGGA-ATGTTCCAGTTTATCAC-----	TGATTATTG	500
Aed.CYP9J1	CTTTACCGGAAAGTCTGATGCC	GCAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----	CAAATGTGC	557
CYP9J2	CTTTACCGGAAAGTCTGATGCC	GTAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----	CAAATGTGC	553
CYP9H1	CATTTACGGGGAGCAAAATGCC	GATA-ATGTACGACCTGATCCA-----	ATCGTGCAG	470
Dros.CYP9C1Dro	CTTTACCCAGCCTCAAAATCCG	ACAG-ATGTTCCGAGCTCATCCA-----	TTTCTGCAA	584
CYP9B1Dro	TCCTCACGTCGGCCAAGATGCC	AAAC-ATGTTCCACCCTGATGAACGAGAGCTTCGCTCAA	498	
Helio.CYP9A1V2	CGTTACCCAGCTCCAAGATGCC	CTG-ATGGTGCCTTCATGGA-----	GGAGATCGC	542

*** *

5'-GAYATGGTYGTRTCGGARACRCT-3'

R

Fun. CYP9M3	ATATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG-----	765
CYP9J14	ATATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG-----	756
CYP9J13	TTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG-----	744
CYP9J12	GTATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG-----	783
CYP9J11	GTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG-----	774
Gamb.CYP9K1	CTATCTGGACATGGTCCGGAACGAGACCGTCCGCAAGTGGACACCGGCACCGTTCCCTCGA	1202
CYP9L1	GTATCTGGATATGGTGTGATCGGAAACCGTACGCAAGTGGTCACCATCACCAGGTACCGA	1211
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	GTACTTGGACCAAGTTCTTACAGAAACTCTTCGCAAAATGGCCCCAGGGCATTTCATCGA	1214
Aed.CYP9J1	CTACTTGGATATGGTTGTATCGGAGACTCTTCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1295
CYP9J2	CTACTTGGATATGGTAGTATCGGAGGCTCTTCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1291
CYP9H1	GTATCTGGACATGGTGGTACTCGAAGCACTTCGTAATGGCCACCATCGATTTCACCGA	1169
Dros.CYP9C1Dro	ATATCTGAACTGCGTGGTGTCCGAGTCCCTGAGAAAGTGGCCACCGCGTTCATCGTGGG	1280
CYP9B1Dro	CTACATGGACATGGTCACTCCGAGTCCCTTCGAAAGTGGACCCTTCGCGCAGCAGCAGA	1154
Helio.CYP9A1V2	GTATTTGGATATGGTGGTTTCTGAGGGACTTCGATTATGGCCCCAGCTGCAGTTGTAGA	1277

Las secuencias de mRNA de genes de CYP9 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar las regiones a partir de las cuales se diseñaron los iniciadores y determinar si están conservadas dentro de la familia. Las secuencias de mRNA utilizadas se detallan en el Cuadro 17 y la alineación se muestra en la Figura 21.

Cuadro 17. Secuencias de mRNA de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 21

CYP9	Especie	Abreviaturas utilizadas en la figura
CYP9M3	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP9J14		
CYP9J13		
CYP9J12		
CYP9J11		
CYP9K1	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP9L1		
CYP9C1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cx.
CYP9B2		
CYP9J1	<i>Aedes aegypti</i>	Aed.
CYP9J2		

Figura 21. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP9 de insectos de la familia Culicidae.

Los nucleótidos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los nucleótidos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. W:A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. F: iniciador forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento

Fun. CYP9M3	-----TTTACCGGCAGCAAAATGCGTAGC-A 25
CYP9J14	-----GCCAAATGCGTGACCA 16
CYP9J13	-----CAG--A 4
CYP9J12	-----TTTACCGGCAGCAAAATGCGTCTG-A 25
CYP9J11	-----TTTACCGGCAGCAAAATGCGTCAG-A 25
Gamb. CYP9K1	CTGGCGCAACATGCGCACTATCCTTAGCCCGGCCTTTACCGGCAGCAAGATGCGGCTA-A 463
CYP9L1	GTGGCGTAACGTGAGGACCACACTTAGTCCCACGTTTACCGGCAGCAAGATGCGGTCAG-A 454
Cx. CYP9C1Cul	-----ATGGTCGTGGCACTGCTGATCACGTTAGCCTTGCCAG 37
CYP9B2Cul	ATGGCGGAATATGAGAGCGATCCTTAGTCCGGCTTTTACGGGTAGCAAAATGAGAGGA-A 475
Aed. CYP9J1	GTGGCGGATATGCGGTCAACTCTGAGTCTGCTTTTACCGGAAAGTCGTATGCGGCAC-A 532
CYP9J2	GTGGCGGATATGCGGTCAACTCTGAGTCTGCTTTTACCGGAAAGTCGTATGCGGCATAC-A 528
	F
	5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'
	5'-GAYATGGTYGTRTCGGARACRCT-3'
	R
Fun. CYP9M3	TGA--AATTCTGCAGAAAAATGAAATATCTGGATATGGTGGTGGAGCFAAACCCCTG----- 765
CYP9J14	TGA--AGCGCTGCAGCATATGAAATATATGGATATGGTGGTGGAGCFAAACCCCTG----- 756
CYP9J13	TGA--AGCGGTGCAGGGCATGCGTTATATGGATATGGTGGTGGAGCFAAACCCCTG----- 744
CYP9J12	TGA--AAAACCTGCAGAGCCTGCCGTATCTGGATATGGTGGTGGAGCFAAACCCCTG----- 783
CYP9J11	TGA--TGCGCTGCAGAACATGCAATATATGGATATGGTGGTGGAGCFAAACCCCTG----- 774
Gamb. CYP9K1	CGA--AACGCTCCAGTCAATGCGCTATCTGGACATGGTCCGCAACGAGACGCTCCGCAAG 1179
CYP9L1	CGA--TGCTCTGCAGGGTATGCGGTATCTGGATATGGTGGTGGAGCFAAACCCCTG----- 1188
Cx. CYP9C1Cul	CGACTGACCCCGCGTGACCTTGCCGACTTTTACGAGGACATCACTTTATCCACTGTTTGA 777
CYP9B2Cul	TGA--AGACATTCACCTCCATGGTGTACTTGGACCAAGTCTTACGAAACTCTTCGCAAA 1191
Aed. CYP9J1	CGA--AGCTCTTCAGAAAGATGGCCTACTTGGATATGGTGGTGGAGACTCTTCGTAAA 1272
CYP9J2	CGA--AGCTCTTCAGAAAGATGGCCTACTTGGATATGGTGGTGGAGACTCTTCGTAAA 1268
	** * * * * *

Debido a que el iniciador reverse de la CYP9 no coincidía con algunas partes de la secuencia, se diseñó un nuevo iniciador basado en el anterior. Para observar cómo se unía el nuevo iniciador se realizó otro alineamiento con secuencias de mRNA de CYP9 de diferentes insectos. Las secuencias de mRNA utilizadas se muestran se detallan en el Cuadro 18 y la alineación se muestra en la Figura 23.

Cuadro 18. Secuencias de mRNA de la familia CYP9 utilizadas para el alineamiento de la Figura 23

Gen CYP9	Insecto	Abreviaturas utilizadas en la figura
CYP9M3	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP9J14		
CYP9J13		
CYP9J12		
CYP9J11		
CYP9K1	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP9L1		
CYP9C1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cx.
CYP9B2		
CYP9J1	<i>Aedes aegypti</i>	Aed.
CYP9J2		
CYP9H1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dros.
CYP9C1		
CYP9B1		
CYP9A1V2	<i>Heliothis virescens</i>	Helio.

Se observa en la Figura 22 la región donde cambio el iniciador anterior para adaptarse mejor a las diferentes secuencias. Este es el complemento reverso.

Figura 22. Región en donde se rediseñó el iniciador CYP9 R.

En negrilla se observa el cambio de TCG- por WSC. Siendo W: A/T, S: C/G, R:A/G, Y: C/T

5'-GAYATGGTUGTRTCGGARACRCT-3'
5'-GAYATGGTYGTRWSCGARACRCT-3'
5'-AGYGTYTCCGAYACRACCATRTC-3'
5'-AGYGTYTCGSWACRACCATRTC-3'

Se observa también la región donde cambio el iniciador original, como aparece publicado en Ameny *et.al.* 2005.

En el Cuadro 19 se observa las diferentes secuencias que tiene la región en donde se une la parte TCG del iniciador inicial y la parte WSC del iniciador rediseñado.

Cuadro 19. Comparación de las diferentes regiones de las secuencias de insectos donde se unen los dos iniciadores reverse de la CYP9.

Iniciador inicial	Iniciador rediseñado
TCG	WSC (A/T-C/G-C)
AGC	AGC
AAC	AAC
TCG	TCG
ACA	ACA
CTC	CTC
TCC	TCC
TCT	TCT
ACT	ACT

Figura 23. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP9 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. W: A/T, R: A/G Y: C/T, S: C/G. F: iniciador forward. R: nuevo complemento reverse del iniciador reverse. Se muestra parte del alineamiento

F 5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'

Fun. CYP9M3	--TTTACCGGCAGCAAAATGCGTAGC-ATGTTTGGCCTGCTGAG-----CAAAGCGC 50
CYP9J14	-----GCCAAATGCGTGACCATGTTTCAGCAGGTGGT-----GGAATGCAG 41
CYP9J13	-----CAG--ATGTTTGAAGCTGATGAG-----CGAAAGCTG 29
CYP9J12	--TTTACCGGCAGCAAAATGCGTCTG-ATGTTTGGCCTGATTGC-----GGAATGCGG 50
CYP9J11	--TTTACCGGCAGCAAAATGCGTCAG-ATGTTTGAAGCTGATTGT-----GGAATGCAG 50
Gamb. CYP9K1	CCTTTACCGGCAGCAAGATGCGGCTA-ATGTTCCGGGCTGATCAC-----GAGCTACTG 488
CYP9L1	CGTTTACCGGCAGCAAGATGCGCCAG-ATGTTCCGCCATGATCTT-----GGAGTGCAG 479
Cx. CYP9C1Cul	CGTTTACCGGCAGCAAGATGCGGAAC-ATGTTCCGAGCTGTTGGC-----GACGTACAG 470
CYP9B2Cul	CTTTTACCGGTAGCAAAATGAGAGGA-ATGTTCCAGTTTATCAC-----TGATTAITG 500
Aed. CYP9J1	CTTTTACCGGAAGTCGTATGCGGCAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----CAAATGTGC 557
CYP9J2	CTTTTACCGGAAGTCGTATGCGGTAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----CAAATGTGC 553
CYP9H1	CATTTACCGGGAGCAAAATGCGGATA-ATGTACGACCTGATCCA-----ATCGTGCAG 470
Dros. CYP9C1Dro	CTTTTACCGGCCTCAAATCCGACAG-ATGTTCCGAGCTCATCCA-----TTTCTGCAA 584
CYP9B1Dro	TCTTTACCGTCCGCAAGATGCGAAAC-ATGTTCCACCTGATGAACGAGAGCTTCGCTCAA 498
Helio. CYP9A1V2	CGTTTACCGAGCTCCAAGATGCGCCTG-ATGGTGCCTTCATGGA-----GGAGATCGC 542

*** *

R

5'-GAYATGGTYGTRWSCGARACRCT-3'

Fun. CYP9M3	ATATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG----- 765
CYP9J14	ATATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG----- 756
CYP9J13	TTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG----- 744
CYP9J12	GTATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG----- 783
CYP9J11	GTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCTG----- 774
Gamb. CYP9K1	CTATCTGGACATGGTCCGGAACGAGACGCTCCGCAAGTGGACACCGGCACCGTTCCCTCGA 1202
CYP9L1	GTATCTGGATATGGTGGTATCGGAAACGCTACGCAAGTGGTCACCATCACCAGGTACCGA 1211
Cx. CYP9C1Cul	GTACTTGGACCAAGTCTTACAGAAACTCTTCGCAAAATGGCCCGAGGCGATTTTCATCGA 1214
CYP9B2Cul	CTACTTGGATATGGTGGTATCGGAGACTCTTCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA 1295
Aed. CYP9J1	CTACTTGGATATGGTAGTATCGGAGGCTCTTCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA 1291
CYP9J2	GTATCTGGACATGGTGGTACTCSAAGCACTCCGTAATGGCCACCATCGATTTCCACCGA 1169
CYP9H1	ATATCTGAACTGCGTGGTTCGCGAGTCCGTGAGAAAAGTGGCCACCGGCGTTTCATCGTGA 1280
Dros. CYP9C1Dro	CTACATGGACATGGTTCATCTCCGAGTCCCTTCGAAAAGTGGACCCCTTTCGGCAGCAGCAGA 1154
CYP9B1Dro	GTATTTGGATATGGTGGTTCCTGAGGGACTTCGATTATGGCCCGAGCTGCAGTTGTAGA 1277
Helio. CYP9A1V2	

Las secuencias de proteínas de genes de la familia CYP6 y CYP9 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar si las regiones conservadas utilizadas para diseñar los iniciadores son específicas para cada familia. Las secuencias de proteínas utilizadas se detallan en el Cuadro 20 y la alineación se muestra en la Figura 24.

Cuadro 20. Secuencias de proteínas de la familia CYP6 y CYP9 de *Anopheles* utilizados para el alineamiento de la Figura 23

Gen CYP6	Número de accesión	Especie	Gen CYP9	Número de accesión	Especie
CYP6P1	AA Y85596.1	<i>Anopheles funestus</i>	CYP9L4	A Y729666.1	<i>Anopheles funestu s</i>
CYP6P9	AA V68097.2		CYP9M3	A Y729665.1	
CYP6P5	AA Z04292.1		CYP9J14	A Y729664.1	
CYP6P4	AA Y85603.1		CYP9J13	A Y729663.1	
CYP6Y1	AA Y85604.1		CYP9J12	A Y729662.1	
CYP6N2	AA Y85601.1		CYP9K1	AF487533.1	<i>Anopheles gambiae</i>
CYP6M1	AA Y85600.1		CYP9L1	XM_320243.3	
CYP6M8	AA V68096.1				
CYP6M7	AA V68095.1				
CYP6AA4	AAL93295.1				
CYP6P3	AAL93295.1	<i>Anopheles gambiae</i>			
CYP6Z1	AAL93296.1				
CYP6P2	AAL93298.1				
CYP6P7	AA Y85596.1	<i>Anopheles minimus</i>			

Figura 24. Alineamiento de secuencias de proteína de la familia CYP6 y CYP9 de insectos.

Los residuos conservados están marcados pro cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos

		LYELAK	
Fun. CYP6P1	-----	WLYELAKNPDIOERLRDELNRAIETN	26
CYP6P9	VGKGEVGMTQRELAQAQAFVFFLAGFETSSTTQSF	LYELAKNPDIOERLRQEQINQAIEN	351
CYP6P5	-----ELAAQVLIFFLAGFETSSTTLSF	LYELAKNPGIQDRLRDEITRAIDN	49
CYP6P4	-----	---LAKNPDIOERLRREEIERGVEDH	22
CYP6Y1	-----DFS	LYELAKQDVQDKARQCVKETLQKY	28
CYP6N2	-----	---AINEQIQRRARQCVLDAVKKH	21
CYP6M1	-----	---LNPEIQEKGRKCVKEILEKR	20
CYP6M8	-----	---LYELAINPEVQEQGRKCVREVLKKH	25
CYP6M7	-----	---LYELAINQDAQDKGRRCVKEVLERH	25
CYP6AA4	-----	---LYELAINPDIOERVRAEVLEKRLKH	25
Gamb. CYP6P3	LGKGEVGMTQRELAQAQAFVFFLAGFETSSTTQSF	LYELAKNPDIOERLRREEINRAIAEN	351
CYP6Z1	---SSGEETLTDQAANVFLFYGAGADTSTGITFT	LHELTINAEAMAKLQREVDENMERH	336
CYP6P2	IGKGEVGMTMNELAAQVFIFFLAGFETSSTTMMF	LYELAKNPDIOERLRREIERAVEEN	349
Min. CYP6P7	VGKGEVGMTQRELAQAQVFIFFLAGFETSSTTMMF	LYELAKNSELQERLRKEINRALEAN	351
Fun. CYP9L4	-----	---LLMQANKGKLHHQPQDRDEVES	154
CYP9M3	-----	---LLLQARKNTLGAEKHDDTLQ	156
CYP9J14	-----	---LLMQAKGILKRHKEQES	153
CYP9J13	-----	---ILMQVKRGLSHQRD	151
CYP9J12	-----	---LLMQAKKGSLSKHQAEPKQEXGT	163
CYP9J11	-----	---LLMQARKGTIKREQRETEDRE	161
Gamb. CYP9K1	-----	---LLMQARKQELRFDENENIETN	183
CYP9L1	-----	---LLIQARKGQLRYQPQSEETDG	298
Fun. CYP6P1	-----		
CYP6P9	RDDPLSAHLFALEGPNWRLRQKLTPTFTSGRMKQMFGLWDVALELDKYME	-ENYRQPD	172
CYP6P5	-----		
CYP6P4	-----		
CYP6Y1	-----		
CYP6N2	-----		
CYP6M1	-----		
CYP6M8	-----		
CYP6M7	-----		
CYP6AA4	-----		
Gamb. CYP6P3	KDDPLTGHLEFALEGQPNWRLRQKLTPTFTSGRMKQMFGLTIRVGLGLEKCM	-QSYNQPI	172
CYP6Z1	HSDPMSANLFAIPGQRWKNLRAKLTPTFTSGQLRHLPTFLAVGSKLEQYLERLANEKQI	165	
CYP6P2	EIDPLSGTLFALQGRKAWKILRQKLTPTFTSGRMKQMFATVLEVAERLQGHVA	-THTG--Q	170
Min. CYP6P7	EVDPLSGTLFALQGKPKWILRQKLTPTFTSGRMKQMFATVLEVAERLQGHVA	-EHLHQEE	172
Fun. CYP9L4	-----	---FTGSKMRQMFSLIVECSNMIHSLAHS	30
CYP9M3	-----	---FTGSKMRSMFGLLSKSGADAMDRLVMFS	34
CYP9J14	-----	---AKCVTMFQVQVVESSGHVQYKKQTDN	31
CYP9J13	-----	---QMFELMSESCQGMVQHLLEEARADE	29
CYP9J12	-----	---FTGSKMRMLFALIAECGQTMVAHFRSEEKAGGTGVQ	37
CYP9J11	-----	---FTGSKMRQMFELIVECSANMAKHYREEIRMGVSSRE	37
Gamb. CYP9K1	FGRALFAMRDTRWRNMRTLLSPA	FTGSKMRMLFGLITSYCDGAVRTIRSELGADG	61
CYP9L1	FSKILFNLTGQRWRNVRTLLSPT	FTGSKMRQMFAMILCESDNMVQALAHPT	174
		FTGSKM PFGE GP	
Fun. CYP6P1	AIHRDPEHYDPPECDFPDRFSAEECKRRLPYTFL	PFGE GP	126
CYP6P9	AIQHDPEHYDPERFDPDRFSPEEVKKRHPFTFL	PFGE GPRVCIGLRFQVLMQTKVGLITL	471
CYP6P5	AIQRDPDHFPDPERFDPDRFPEEVKKRHPYVYL	-----	143
CYP6P4	AIQRDPEFYEPDQFNPDRLPEGVKQRHPYVFLP	-----	117
CYP6Y1	AMHDSHFDPPEQYRPERFSPEEVAKRDPYCYL	PFGE GPR	129
CYP6N2	AIHHDPEHYDPERYDPRFAADASEARKPYSFI	PFGE GP	120
CYP6M1	AIQRSDSIFPEPEKFDPERFSPEEEAKRHPFAWI	-----	114
CYP6M8	AIHHDPAVFPDPERYDPERFSPEQAKRHPYAMT	PFGE GP	125
CYP6M7	AIHRDPEHFPNDFDPRFPEEEAKRHPYAMT	PFGE GP	125
CYP6AA4	AIHHDATIYPDPKRFDPDRFATDALHSRHTAFL	PFGE GP	125
Gamb. CYP6P3	AIQRDPDHYPDPERFDPDRFLPEEVKKRHPFTFI	PFGE GPRICIGLRFQVLMQTKVGLITL	471
CYP6Z1	GISMNEKYFPEPELYSPERFD-EATKNYDADAYY	PFGE GPRNCIGLRFQVLMQTKVGLITL	455
CYP6P2	ALHDAQYYPDPERFDPDRFPEEVANARPAYVYMP	PFGE GPRICIGLRFQVLMQTKVGLITL	469
Min. CYP6P7	ALHHDPEYYPEPERFDPDRFPEEVANARPPYVYMP	PFGE GPRICIGMRFGMMQTKVGLITL	471
Fun. CYP9L4	QQLRYEEILQASESPG-WKSLTYDALQGMRYLDMVVSETL	-----	250
CYP9M3	QDLRAEIDETREELEDGKTPTYEILQKMKYLDMMVVSETL	-----	255
CYP9J14	QDLRYEEIVATDIDLQ-QKPLTYEALQHMKYMDMMVVSETL	-----	252
CYP9J13	QDLRYEEIVGVDEKLM-GKPLNYEAVQGMRYLDMVVSETL	-----	248
CYP9J12	QXRLFEEVHESEQSLEEGKSLSYEKLQSLPYLDMVVSETL	-----	261
CYP9J11	QNKLYEEIRATSKSLG-GSSLTYPDALQNMRYLDMVVSETL	-----	258
Gamb. CYP9K1	-----		
CYP9L1	QQLRYEEIQVSETLD-GKALTYDALQGMRYLDMVVSETL	ETLRKWSPPSGTDRMCMQDYTIP	414
		ETLR	

Los iniciadores degenerados fueron analizados con el programa OligoAnalyzer para determinar el T_m, la formación de estructuras de lazo, de heterodímeros y homodímeros.

2. Análisis en OligoAnalyzer de iniciadores degenerados. En el cuadro 21 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6. En el cuadro 22 la formación de estructuras de lazo y en el 23 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador.

Cuadro 21. Resultados del análisis del iniciador CYP6 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6 F	Iniciador CYP6 R
Largo	19	17
Contenido GC:	55.30%	76.50%
Tempreatura meLT	64.8°C	64.7°C

Cuadro 22. Resultados del análisis del iniciador CYP6 para estructuras de Hairpin

CYP6 F		CYP6 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-0.57	1	-5.57
2	-0.54		

Cuadro 23. Resultados del análisis del iniciador CYP6 para formación de homodímeros y heteodímeros

Iniciador Forward CYP6		Iniciador Forward y Reverse CYP6		Iniciador Reverse CYP6	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-9.99	7	-6.78	4	-12.2	6
-6.78	4	-3.61	2	-9.06	5
-6.69	4	-3.14	2	-6.68	3
-6.44	5	-3.09	3	-6.21	3
-6.34	4	-3.05	3	-5.49	3
-4.74	3	-2.51	2	-3.61	2
-3.61	2	-1.95	2	-3.14	2
-3.3	3	-1.57	2	-3.07	2
-3.17	3	-1.57	2	-1.57	2
-3.09	3	-1.47	2		
-2.51	2				
-1.95	2				
-1.57	2				
-1.47	2				

En el Cuadro 24 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP9. En el Cuadro 25 la formación de estructuras de lazo y en el Cuadro 26 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador.

Cuadro 24. Resultados del análisis del iniciador CYP9 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP9 F	Iniciador CYP9 R
Largo	20	23
Contenido GC:	55.00%	50.00%
Temperatura m_eL_T	65.5°C	64.7

Cuadro 25. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para estructuras de Hairpin

CYP9 F		CYP9 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-1.33	1	-1,86
2	-1.03		

Cuadro 26. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para formación de homodímeros y heteodímeros

Iniciador Forward CYP9		Iniciador Forward y Reverse CYP9		Iniciador Reverse CYP9	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-9.75	4	-6.75	3	-8.13	5
-5.09	3	-6.68	3	-4.89	4
-3.72	3	-3.72	3	-4.34	3
-3.61	2	-3.61	2	-4.12	3
-3.14	2	-3.43	3	-3.61	3
-1.95	2	-3.23	3	-3.1	3
-1.94	2	-3.14	2	-2.78	2
-1.76	2	-3.07	3	-2.24	2
-1.47	2	-2.8	3	-1.77	2
-1.46	2	-1.95	2	-1.76	2
		-1.94	2	-1.47	2
		-1.76	2	-1.46	2
		-1.47	2	-1.41	2
		-1.34	2		

En el Cuadro 27 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP9 con el iniciador R rediseñado. En el Cuadro 28 la formación de estructuras de lazo y en el Cuadro 29 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador.

Cuadro 27. Resultados del análisis del iniciador CYP9 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP9 F	Iniciador CYP9 R
Largo	20	23
Contenido GC:	55.00%	50.00%
Temperatura m_eLT	65.5°C	64.8

Cuadro 28. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para estructuras de Hairpin

CYP9 F		CYP9 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-1.33	1	1.26
2	-1.03	2	1.45
		3	1.82

Cuadro 29. Resultados del análisis del iniciador CYP9 para formación de homodímeros y heterodímeros

Iniciador Forward CYP9		Iniciador Forward y Reverse CYP9		Iniciador Reverse CYP9	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-9.75	4	-11.4	4	-8.13	5
-5.09	3	-5.19	3	-6.31	4
-3.72	3	-4.72	3	-5.19	4
-3.61	2	-4.54	3	-5.02	3
-3.14	2	-4.41	3	-4.89	4
-1.95	2	-4.38	4	-4.72	3
-1.94	2	-3.84	3	-4.66	4
-1.76	2	-3.53	3	-4.34	4
-1.47	2	-3.35	3	-4.12	3
-1.46	2	-3.2	3	-3.61	2
		-2.98	3	-3.2	3
		-2.78	2	-3.1	2
		-2.24	2	-3.07	2
		-1.95	2	-2.78	2
		-1.76	2	-2.24	2
		-1.6	2	-1.77	2
		-1.58	2	-1.62	2
		-1.57	2	-1.58	2
		-1.46	2	-1.46	2
				-1.41	2

B. Resultados del análisis de los iniciadores específicos

1. Análisis en BLAST de iniciadores específicos. Se realizaron alineamientos de cada iniciador específico con CYP6P9, CYP6P4, CYP6AA4, CYP6P3, CYP6P1 y CYP6M2 en BLAST con la base de datos de Anofelinos. Los resultados se muestran en los cuadros 30-35.

Cuadro 30. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P9 con secuencias de Anofelinos

Iniciador	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura del alineamiento	E-valor
CYP6P9 F	Gen CYP6P13 de <i>A. funestus</i>	42.1	42.1	55%	4.00E-04
	mARN de CYP6P9 de <i>A. funestus</i>	42.1	42.1	55%	4.00E-04
	Anopheles funestus CYP6P9 gene, complete cds	42.1	42.1	55%	4.00E-04
	mARN AGAP010245 (AgaP_AGAP010245) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	36%	5.4
CYP6P9 R	mARN CYP6P9 <i>A. funestus</i> CYP6P9	40.1	40.1	51%	0.001
	Gen CYP6P9 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	51%	0.001
	Proteína de serina producida en respuesta a la infección en <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	43%	0.092
	Gen de la cutícula específico de la pupa de <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	43%	0.092
	Anopheles gambiae Pen-1 region; BAC clones 30N20, 10K02, 13E09, 31J16 and 01G10 from library NotreDame1 of Anopheles gambiae (African malaria mosquito) strain PEST	30.2	311	89%	1.4

Cuadro 31. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P4 con secuencias de Anofelinos

Iniciadores	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura del alineamiento	E-valor
CYP6P4 F	Gen CYP6P4 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	52%	0.001
	mARN AGAP002159-PA (AgaP_AGAP002159) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	30.2	30.2	50%	1.4
	mARN AGAP001954-PA (AgaP_AGAP001954) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	36%	5.4
	mARN AGAP011131-PA (AgaP_AGAP011131) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	36%	5.4
	Single read from an extremity of a full-length cDNA clone made from Anopheles gambiae total adult females. 3-PRIME end of clone FK0AAC48BB02 of strain 6-9 of Anopheles gambiae (African malaria mosquito)	28.2	28.2	36%	5.4
	Gen CYP6P4 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	52%	0.001
CYP6P4 R	Proteína de serina producida en respuesta a la infección en <i>A. gambiae</i>	32.2	32.2	42%	0.35
	Gen de la cutícula específico de la pupa de <i>A. gambiae</i>	32.2	32.2	42%	0.35
	mARN AGAP012715-PA (AgaP_AGAP012715) <i>A. gambiae</i>	26.3	26.3	34%	21
	mARN AGAP012588-PA (AgaP_AGAP012588) <i>A. gambiae</i>	26.3	26.3	34%	21

Cuadro 32. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6AA4 con secuencias de Anofelinos

Iniciador	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura del alineamiento	E-valor
CYP6AA4 F	Gen CYP6AA4 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	52%	0.001
	mARN AGAP010077-PA (AgaP_AGAP010077) <i>A. gambiae</i> cepa PEST (CYP)	28.2	28.2	36%	5.4
	mARN AGAP002159-PA (AgaP_AGAP002159) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	47%	5.4
	Gen CYP6AA2 <i>A. funestus</i>	26.3	26.3	34%	21
	mARN AGAP008989-PA (AgaP_AGAP008989) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	26.3	26.3	34%	21
CYP6AA4 R	Gen CYP6AA4 <i>A. funestus</i>	42.1	42.1	53%	4.00E-04
	Proteína de serina producida en respuesta a la infección en <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	43%	0.092
	Gen de la cutícula específico de la pupa de <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	43%	0.092
	mARN AGAP012715-PA (AgaP_AGAP012715) <i>A. gambiae</i>	26.3	26.3	33%	22
	mARN AGAP012588-PA (AgaP_AGAP012588) <i>A. gambiae</i>	26.3	26.3	33%	22

Cuadro 33. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P3 con secuencias de Anofelinos

Iniciador	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura del alineamiento	E-valor
CYP6P3 F	mARN AGAP002865-PA (AgaP_AGAP002865) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN CYP6P3 <i>A. gambiae</i>	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN CYP6P9 <i>A. funestus</i>	34.2	34.2	85%	0.024
	Gen CYP6P13 <i>A. funestus</i>	34.2	34.2	85%	0.024
	mARN CYP6P9 <i>A. funestus</i>	34.2	34.2	85%	0.024
CYP6P3 R	Gen CYP6P9 <i>A. funestus</i>	34.2	34.2	85%	0.024
	mARN AGAP002865-PA (AgaP_AGAP002865) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN CYP6P3 <i>A. gambiae</i>	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN AGAP007808-PA (AgaP_AGAP007808) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	70%	1.5
	mARN AGAP011719-PA (AgaP_AGAP011719) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	26.3	26.3	65%	5.9
mARN AGAP011097-PA (AgaP_AGAP011097) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	26.3	26.3	65%	5.9	

Cuadro 34. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P1 con secuencias de Anofelinos

Iniciador	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura del alineamiento	E-valor
CYP6P1 F	Gen secuencia parcial CYP6P1 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	52%	0.001
	Gen secuencia CYP6P1 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	52%	0.001
	mARN AGAP007010-PA (AgaP_AGAP007010) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	30.2	30.2	39%	1.4
	mARN AGAP004637-PA (AgaP_AGAP004637) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	36%	5.4
	mARN AGAP000273-PA (AgaP_AGAP000273) <i>A. gambiae</i> cepa. PEST	28.2	28.2	36%	5.4
	mARN CYP6P1 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	51%	0.001
CYP6P1 R	Gen CYP6P1 <i>A. funestus</i>	40.1	40.1	51%	0.001
	Proteína de serina producida en respuesta a la infección en <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	43%	0.092
	Gen de la cutícula específico de la pupa de <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	43%	0.092
	mARN AGAP007647-PA (AgaP_AGAP007647) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	35%	5.7

Cuadro 35. Resultados de alineamiento del iniciador CYP6P1 con secuencias de Anofelinos

Iniciador	Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura del alineamiento	E-valor
CYP6M2 F	mARN AGAP008212-PA (AgaP_AGAP008212) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN CYPm3r9 <i>A. gambiae</i>	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN AGAP012181-PA (AgaP_AGAP012181) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	26.3	26.3	85%	5.9
	ARN ribosomal 18S <i>A. fluviatilis</i> secuencia parcial	24.3	68.9	60%	23
	ARN ribosomal 18S <i>A. fluviatilis</i> secuencia parcial	24.3	68.9	60%	23
CYP6M2 R	mARN AGAP008212-PA (AgaP_AGAP008212) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	40.1	40.1	100%	4.00E-04
	mARN CYPm3r9 <i>A. gambiae</i>	34.2	34.2	85%	0.024
	mARN AGAP008889-PA (AgaP_AGAP008889) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	70%	1.5
	mARN protein cuticular CPLC15 <i>A. gambiae</i> cepa PEST	28.2	28.2	70%	1.5
	mARN AGAP001687-PA (AgaP_AGAP001687) <i>A. gambiae</i> cepa PEST	26.3	26.3	65%	5.9

2. Análisis en ClustalW de iniciadores CYP6P3 y CYP6AA. Debido a que los iniciadores forward CYP6P3 y CYP6AA4 fueron los únicos en presentaron un alineamiento con otro CYP de otra especie, se realizó un alineamiento de los iniciadores con secuencias de mARN de la familia CYP6. Las secuencias de mARN de genes de CYP6 de insectos de la familia *Culicidae* se alinearon para determinar si las regiones donde se unen los iniciadores CYP6P3 y CYP6AA4 no son conservadas, ya que se busca que el iniciador sea específico. Las secuencias de mARN utilizadas se detallan en el Cuadro 36 y la alineación se muestra en la Figura 25.

Cuadro 36. Secuencias de mARN de la familia CYP6 utilizados para el alineamiento de la Figura 25

Gen CYP	Insecto	Abreviaturas utilizadas en la figura
CYP6P3	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP6P9	<i>Anopheles funestus</i>	Fun.
CYP6M8		
CYP6M7		
CYP6AA4		
CYP6Z1	<i>Anopheles gambiae</i>	Gamb.
CYP6P2		
CYP6M1		
CYP6P7	<i>Anopheles minimus</i>	Min.

Figura 25. Alineamiento de secuencias de mRNA de la familia CYP6.
Los cuadros señalan las regiones donde se hibridizan los iniciadores específicos para CYP6P3 de
***A. gambiae*. F: iniciador forward. R: complemento reverse del iniciador reverse**

		CYP6P	
Gamb. CYP6P3	GGAGCGGCTGAGAGGAAATTAATCGAGCTATTGCCGAGAACGGTGGAGAGGTGACGTA	1070	F CYP6AA4
Fun. CYP6P9	GGAGCGCCTTAGACAAGAGATCAACCAAGCAATCGAGGAGAATGACGGCCAGGTGACGTA	1070	5'-AGGTGACACTATAGAATATCCCGGTC
CYP6M8	GGAACAGGGCCGTAATGCGTGCCTGAAGTGCCTGAAAACATAAACGGCGAAATGACGTA	92	GGTAATATGAAA-3'
CYP6M7	GGATAAAGGCCGCTGTTGCGTGAAAGAAAGTCTGGAACGTCATAACGGCGAACTGACCTA	92	
CYP6AA4	GGAACTGTGCGTGGGAAAGTCTGGAAGAACTGAACTGCAATGATTAACCGAATACCTA	92	
Gamb. CYP6Z1	GGCTAAGCTTCAGCGAGAGTCCGATGAGATGATGGAGCGACACCACGGTGAAATCACGTA	1025	R
CYP6P2	GGAGCGGTTGAGCGGGAAATCGAGCGTCCGGTGGAGGAGAACGGTGGCGAGCTGACGTA	1064	5'-ACTTCATGCTTAAGCCGGTGTCCCT
CYP6M1	GGAAAAGGAGCGCCAGTGTCTGCAAGAAAGTCTGCCAAGCATAATGGGAGATGACGTA	1037	ATAGTGAGTCGTAC-3'
Min. CYP6P7	GGAACTGCTCCGAAAGAAATTAACCGAGCGCTCCAGGCCAATGGTGGGAACTGACGTA	1070	
	** * * * *		
Gamb. CYP6P3	CGACGTGGTTCATGAACATAAAAGTATTTGGACAATGTGATTGACGAAACCCCTTCGGAAAGTA	1130	
Fun. CYP6P9	CGATGTCGCCATAAACATACAGTATCTGGACAATGTGATAAACGAAACACTTCCGCAAGTA	1130	
CYP6M8	TGATGCCGGTGGTGGATATGAAATATCTGGATCAGATTCTGAACGAAAGCCTGCGTAAATA	152	
CYP6M7	TGATGCCGGTGGTGGAAATGCATTATCTGGATCAGATTCCGAAAAGAAAGCCTGCGTAAATA	152	
CYP6AA4	TGATGCCGCTGAAAGAAATGACCTATCTG ATCAGGTGATTAACGAAACCCCTGCGTATGTA	152	
Gamb. CYP6Z1	CGATAACATCACCGGGATGAAGTATCTGGATTGTGCGTGAAGGAAACGCTTCGAATCTA	1085	
CYP6P2	CGATGTAGTGTGGGAAACGGAGTACCTCAACTGGGTCGTGGATGAAACGCTGCGCAAGTA	1124	
CYP6M1	CGACGCTATCCACGACATGAAGTATTTGGATCAAAATTTGAAAAGAAATCCCTACGCAAGTA	1097	
Min. CYP6P7	TGACGTTGTGATGGGTATCGAATATCTGAATAAGGTGCTTGATGAAACGCTTCGCAAGTA	1130	
	** * * * *		
5'-AGCTAATTAACGGGTGCTG-3'			
F			
Gamb. CYP6P3	ATGGAGCTAATTAACGCGG---TGCTG	57	
Fun. CYP6P9	ATGGAGCTAATTAACGCGG---TGCTG	57	
CYP6M8	-----		
CYP6M7	-----		
CYP6AA4	-----		
Gamb. CYP6Z1	-----ATGATCCTTACACGATCGGACTGATCGTGCGCTTTGTTTTT	42	
CYP6P2	ATGGAGCTCTTGACCTTGA---CTTTGCTGTGCTGCGCTCGCGACCGGGCTGTAT	57	
CYP6M1	ATGTGGTTCCTCAACATAGAAGTCTCTGAGCGCTTCTGGCACTACTCGGTGGAGCAGTG	60	CYP6P3
Min. CYP6P7	ATGGAGCTCGTAACACTAAA---TTTTATCAITACTATTTGTGCTAGCGTCCGGGTGTAT	57	
R 5'-TACGCTCCGAATCCACACTT-3'			
Gamb. CYP6P3	CTGTT ATACGCAATAAGCATAACTATTGGAAGGACAATGATTTCCG TACGCTCCGAAT	117	
Fun. CYP6P9	CTTTTT ATTCCGGAACAAACATAAATTACTGGAAAAGACGATGGATTCCCG TATGCGCGGAAC	117	
CYP6M8	-----		
CYP6M7	-----		
CYP6AA4	-----		
Gamb. CYP6Z1	CTCGCCCTCAAGTACGTTACTCTACTGGGATCGACAGGGGCTGCCGAAT---TTGAGG	99	
CYP6P2	CTGTTTGTGCGCAACCGGTACAATTACTGGAGCAACCGTCAGTTTCCACCCGTGCCAAC	117	
CYP6M1	TACTTTATCGTACCAAAACAATCTACTGGAAGGAGCGTGGCGTACCAGC---CCAAAG	117	
Min. CYP6P7	TGGTTCTTGGCGAATCGGTACAACACTACTGGACTAACCGTGGCTTCCGACCGTTCCCAAT	117	

3. Análisis en OligoAnalyzer de iniciadores específicos. En el Cuadro 37 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6P9. En el Cuadro 38 la formación de estructuras de lazo y en el 39 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador. Este iniciador fue diseñado para *A. funestus*.

Cuadro 37. Resultados del análisis del iniciador CYP6P9 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6P9 F	Iniciador CYP6P9 R
Largo	38	39
Contenido GC:	44.70%	46.20%
Tm	63.1°C	64.6°C

Cuadro 38. Resultados del análisis del iniciador CYP6P9 para estructuras de Hairpin

CYP6P9 F		CYP6P9 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-4.75	1	-1.62
2	-2.93	2	-0.97
		3	-0.81

Cuadro 39. Resultados del análisis del iniciador CYP6P9 para formación de homodímeros y heteodímeros

Iniciador Forward CYP6P9		Iniciador Forward y Reverse CYP6P9		Iniciador Reverse CYP6P9	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-8.77	7	-8.26	4	-6.59	6
-6.59	6	-7.49	5	-4.41	3
-4.89	4	-7.13	4	-3.65	4
-3.61	2	-6.59	6	-3.61	2
-3.52	3	-6.53	4	-3.3	3
-3.3	3	-5.86	5	-3.29	3
-3.17	3	-4.89	4	-3.07	2
-3.14	2	-4.87	4	-1.95	2
-2.44	3	-4.41	3	-1.94	2
-1.95	2	-3.52	3	-1.6	2
-1.6	2	-3.3	3	-1.57	2
-1.57	2	-2.94	3	-1.47	2
-1.34	2	-2.92	3	-1.34	2
-0.96	2	-2.44	3	-0.96	2
		-1.95	2		
		-1.94	2		
		-1.6	2		
		-1.57	2		
		-1.47	2		
		-1.34	2		
		-0.96	2		

En el Cuadro 40 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6P4. En el Cuadro 41 la formación de estructuras de lazo y en el 42 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador. Este iniciador fue diseñado para *A. funestus*.

Cuadro 40. Resultados del análisis del iniciador CYP6P4 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6P4 F	Iniciador CYP6P4 R
Largo	38	39
Contenido GC:	44.70%	48.70%
Tm	64.0°C	64.9°C

Cuadro 41. Resultados del análisis del iniciador CYP6P4 para estructuras de Hairpin

CYP6P4 F		CYP6P4 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-2.85	1	-0.88

Cuadro 42. Resultados del análisis del iniciador CYP6P4 para formación de homodímeros y heterodímeros

Iniciador Forward CYP6P4		Iniciador Forward y Reverse CYP6P4		Iniciador Reverse CYP6P4	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-14.2	8	-6.59	6	-6.59	6
-6.59	6	-5.02	3	-5.19	3
-5.02	3	-4.87	4	-4.62	4
-4.41	3	-4.41	3	-3.65	4
-4.03	4	-4.03	4	-3.61	2
-3.3	3	-3.53	3	-2.3	3
-3.07	2	-3.3	3	-1.95	2
-1.95	2	-3.17	3	-1.6	2
-1.6	2	-3.07	2	-1.57	2
-1.47	2	-2.94	3	-1.34	2
-1.34	2	-1.95	2	-0.96	2
-0.96	2	-1.6	2		
		-1.57	2		
		-1.47	2		
		-1.34	2		
		-0.96	2		

En el Cuadro 43 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6AA4. En el Cuadro 44 la formación de estructuras de lazo y en el Cuadro 45 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador. Este iniciador fue diseñado para *A. funestus*.

Cuadro 43. Resultados del análisis del iniciador CYP6AA4 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6AA4 F	Iniciador CYP6AA4 R
Largo	38	39
Contenido GC:	39.50%	48.70%
Temperatura meLT	61.7 °C	65.5 °C

Cuadro 44. Resultados del análisis del iniciador CYP6AA4 para estructuras de Hairpin

CYP6AA4 F		CYP6AA4 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-0.47	1	-1.46
		2	-0.76

Cuadro 45. Resultados del análisis del iniciador CYP6AA4 para formación de homodímeros y heterodímeros

Iniciador Forward CYP6AA4		Iniciador Forward y Reverse CYP6AA4		Iniciador Reverse CYP6AA4	
ΔG (Kcal/mol)	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol)	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol)	Pares de bases que forman el homodímero
-9.75	4	-11.09	5	-14.33	8
-6.68	3	-8.02	4	-9.75	4
-6.59	6	-7.71	4	-6.59	6
-3.91	4	-6.59	6	-5.38	4
-3.61	2	-6.53	4	-3.65	4
-3.3	3	-4.87	4	-3.61	2
-3.07	3	-3.61	2	-3.54	3
-2.92	3	-3.53	3	-3.53	3
-2.44	3	-3.43	3	-3.14	2
-1.95	2	-3.07	2	-3.07	2
-1.6	2	-2.94	3	-2.94	3
-1.57	2	-2.91	3	-1.95	2
-1.47	2	-2.44	3	-1.6	2
-1.34	2	-1.95	2	-1.57	2
-0.96	2	-1.94	2	-1.34	2
		-1.6	2	-0.96	2
		-1.57	2		
		-1.47	2		
		-1.34	2		
		-0.96	2		

En el Cuadro 46 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6P3. En el Cuadro 47 la formación de estructuras de lazo y en el Cuadro 48 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador. Este iniciador fue diseñado para *A. gambiae*.

Cuadro 46. Resultados del análisis del iniciador CYP6P3 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6P3 F	Iniciador CYP6P3 R
Largo	20	20
Contenido GC:	50.00%	50.00%
Temperatura meLT	55.7 °C	56.2 °C

Cuadro 47. Resultados del análisis del iniciador CYP6P3 para estructuras de Hairpin

CYP6P3 F		CYP6P3 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-0.3	1	0.3

Cuadro 48. Resultados del análisis del iniciador CYP6P3 para formación de homodímeros y heterodímeros

Iniciador Forward CYP6P3		Iniciador Forward y Reverse CYP6P3		Iniciador Reverse CYP6P3	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-10.36	4	-8.09	4	-3.61	2
-7.29	6	-4.74	3	-3.14	2
-6.34	4	-3.61	2	-1.94	2
-4.85	4	-3.42	3	-1.57	2
-4.74	3	-1.94	2	-1.47	2
-3.61	2	-1.6	2	-0.96	2
-3.14	2	-1.34	2		
-1.34	2	-0.96	2		
-0.96	2				

En el Cuadro 49 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6P1. En el Cuadro 50 la formación de estructuras de lazo y en el Cuadro 51 la formación

de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador. Este iniciador fue diseñado para *A. funestus*.

Cuadro 49. Resultados del análisis del iniciador CYP6P1 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6P1 F	Iniciador CYP6P1 R
Largo	38	39
Contenido GC:	44.70%	48.70%
Temperatura meLT	63.1 °C	65.2 °C

Cuadro 50. Resultados del análisis del iniciador CYP6P1 para estructuras de Hairpin

CYP6P1 F		CYP6P1 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	-0.18	1	-1.35
		2	-0.72

Cuadro 51. Resultados del análisis del iniciador CYP6P1 para formación de homodímeros y heteodímeros

Iniciador Forward CYP6P1		Iniciador Forward y Reverse CYP6P1		Iniciador Reverse CYP6P1	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-10.36	4	-12.7	8	-13.39	8
-6.59	6	-6.59	6	-6.59	6
-4.41	3	-6.14	3	-4.67	3
-3.61	2	-5.91	4	-4.64	3
-3.52	3	-4.87	4	-3.65	4
-3.3	3	-4.67	3	-3.61	2
-3.07	2	-4.41	3	-3.07	2
-2.94	3	-3.61	2	-1.6	2
-2.56	3	-3.53	3	-1.57	2
-2.44	3	-3.52	3	-1.34	2
-2.3	3	-3.29	3	-0.96	2
-1.94	2	-3.14	2		
-1.6	2	-3.07	2		
-1.47	2	-2.94	3		
-1.34	2	-2.56	3		
-0.96	2	-2.44	3		
		-2.3	3		
		-1.95	2		
		-1.94	2		
		-1.6	2		
		-1.57	2		
		-1.47	2		
		-1.34	2		
		-0.96	2		

En el Cuadro 52 se observan las características generales de los oligonucleótidos CYP6M2. En el Cuadro 53 la formación de estructuras de lazo y en el Cuadro 54 la formación de homodímeros con el mismo y con el otro iniciador. Este iniciador fue diseñado para *A. gambiae*.

Cuadro 52. Resultados del análisis del iniciador CYP6M2 en Oligo Analyzer

Característica	Iniciador CYP6M2 F	Iniciador CYP6M2 R
Largo	20	20
Contenido GC:	55.00%	55.00%
Tempreatura meLT	57.3 °C	55.5 °C

Cuadro 53. Resultados del análisis del iniciador CYP6M2 para estructuras de Hairpin

CYP6M2 F		CYP6M2 R	
Estructura	ΔG (Kcal/mol)	Estructura	ΔG (Kcal/mol)
1	1.23	1	-2.18
2	1.43		
3	1.7		

Cuadro 54. Resultados del análisis del iniciador CYP6M2 para formación de homodímeros y heterodímeros

Iniciador Forward CYP6M2		Iniciador Forward y Reverse CYP6M2		Iniciador Reverse CYP6M2	
ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero	ΔG (Kcal/mol) heterodímero	Pares de bases que forman el heterodímero	ΔG (Kcal/mol) homodímero	Pares de bases que forman el homodímero
-9.45	6	-6.37	4	-9.75	4
-5.19	3	-4.64	3	-4.41	3
-3.61	2	-3.61	2	-3.65	4
-1.57	2	-3.52	3	-3.07	2
-1.34	2	-3.07	2	-1.47	2
		-2.92	3	-1.34	2
		-1.95	2		
		-1.94	2		
		-1.57	2		
		-1.34	2		

VII. DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo de graduación fue validar *in silico* iniciadores reportados en la literatura para la amplificación del mARN de genes de las familias CYP6 y CYP9 del citocromo P450 en *A. albimanus*.

Se validaron iniciadores degenerados de la familia CYP6 y CYP9. Estos iniciadores están diseñados para amplificar todos los posibles citocromos de la familia 6 y 9 que hay en *A. albimanus*. Para validar los iniciadores degenerados, se realizaron alineamientos de secuencias de proteína y mARN de diferentes insectos y de la familia *Culicidae*.

En los alineamientos que se muestran en la figura 14 y 16, se observan las regiones que se utilizaron en Ameny, *et.al.* 2005 para diseñar los iniciadores degenerados para CYP6 y CYP9. En los dos alineamientos se utilizaron insectos como *D. melanogaster*, *M. domestica*, *Cx. Quinquefasciatus*, *Ae. Aegypti*, *A. gambiae*, *A. fuenstus* y *Heliothis virescens*. Se observa en la Figura 14 que la región LYELAK es altamente conservada entre las diferentes especies de insectos, al igual que la región de unión al hem PFGEGP. Las secuencias de insectos utilizadas para este alineamiento pertenecen al orden *Diptera*. Los resultados muestran que estas regiones se encuentran conservadas desde el orden, a pesar que los insectos pertenecen a diferentes subórdenes. Debido a que las regiones son altamente conservadas desde el orden de los insectos, se puede asumir que está región es conservada también en *A. albimanus* del orden *Diptera*, por lo que estos iniciadores se pueden utilizar para amplificar genes CYP6.

En el alineamiento de la Figura 16 las regiones conservadas utilizadas fueron FTGSKM y ETLR de CYP9. Estas regiones también están conservadas en las diferentes especies. En este caso se utilizaron secuencias de insectos del mismo superorden, *Endopterygota*. Se observa que las regiones están altamente conservadas, y que solamente varían en uno o dos residuos. Debido a que las secuencias de proteínas se encuentran altamente conservadas desde el superorden, también se puede decir que están conservadas en *A. albimanus*.

En los alineamientos de las Figuras 15 y 17 se utilizaron secuencias de insectos de la familia *Culicidae* a la cual pertenecen los Anofelinos y otros vectores como *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*. En estos alineamientos también se observa que, las regiones utilizadas para diseñar los iniciadores están conservadas en los insectos de esta familia. Esto confirma que es probable que estas regiones también estén conservadas en *A. albimanus* ya que pertenece a la familia *Culicidae*. Estos dos géneros, el *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* están separados

filogenéticamente, por lo que si una proteína esta conservada en los diferentes géneros es probable que en alguna especie de uno de estos dos géneros tenga la misma conservación.

La Figura 18 y 20 muestran los alineamientos de secuencias de mARN de diferentes insectos y donde se hibridizan los iniciadores. En las dos figuras las secuencias utilizadas fueron de insectos del superorden *Endopterygota* al igual que en la figura 8. También se observa que las regiones donde se unen los iniciadores están conservadas en las diferentes secuencias y solamente varían pocos nucleótidos. Esto indica que si las regiones en donde se unen los iniciadores son altamente conservadas dentro del superorden, es probable que en *A. albimanus* también estén conservadas a nivel de mARN y de proteína.

En los alineamientos de las Figuras 19 y 21 se utilizaron secuencias de insectos de la familia *Culicidae*. En estos alineamientos se observa que las regiones donde se unen los iniciadores de la CYP6 y el iniciador forward de la CYP9, están conservadas dentro de la familia, por lo que si se podrían utilizar para amplificar genes de *A. albimanus*.

El iniciador reverse de la CYP9 contiene una parte que no coincide con la región conservada con la que se une el resto del iniciador. La secuencia en el iniciador es TCG, esta región de la secuencia es variable en los diferentes insectos habiendo secuencias como TCT, AGC, AAC, ACA, CTC, TCC y TCG; esto se observa en el alineamiento de la Figura 14. Solamente tres CYP, CYP9J2, CYP9J1 y CYP9L1 presentaron la misma secuencia del iniciador. Se observa lo mismo en la Figura 16 en donde la mayoría de secuencias de insectos de la familia *Culicidae* tienen esta parte de la secuencia muy variable. Esto sugiere que este iniciador puede que no amplifique todos los CYP9 de *A. albimanus*. Por esto se rediseñó el iniciador reverse cambiando la región TCG por WSC como se observa en la Figura 22. La secuencia WSC puede unirse a diferentes secuencias ya que es más variable que la secuencia TCG. Se escogió la secuencia WSC como parte del nuevo iniciador ya que formó menos estructuras de lazo, heterodímeros y homodímeros, así mismo estas estructuras son poco estables. Además se adapta mejor a las secuencias ya que al ser más degenerado permite amplificar más secuencias diferentes.

En la Figura 19 se observa que algunas secuencias no contienen partes donde se une el iniciador. Por ejemplo, las secuencias CYP6AA4, CYP6M8 y CYP6M7 no contienen las cinco primeras pares de bases del iniciador forward. Es posible que el iniciador aún funcione para este tipo de secuencias al momento de realizar un PCR ya que en Amenya, *et.al.* 2005 se utiliza una temperatura de annealing baja para poder amplificar la mayor cantidad posible de genes de la familia CYP. Por lo que se sugiere utilizar condiciones similares durante las

amplificaciones en *A. Albimanus* para maximizar la probabilidad de amplificar la mayoría de miembros de esta familia.

Debido a que las familias CYP6 y CYP9 comparten regiones conservadas en común como ETLR, es importante que los iniciadores degenerados sean específicos para cada familia. En el alineamiento de la Figura 15 se observan las regiones utilizadas para diseñar los iniciadores. Los iniciadores forward son específicos para cada familia, ya que la región utilizada para diseñar el iniciador CYP6 es propia de esta familia y no se encuentra en la familia CYP9. Así mismo, la región para el iniciador forward CYP9 se encuentra solo en esta familia y no en la CYP6. Para el diseño del iniciador reverse de CYP9 se utilizó la región ETLR la cual tiene en común con la CYP6. Debido a que el iniciador forward es específico si se podrían amplificar secuencias de la familia CYP6. La CYP9 posee un grupo hemo con secuencia variable y distinta a la del CYP6.

Las familias de genes CYP6 y CYP9 de insectos *Culicidae* mostraron regiones altamente conservadas, por lo que se podrían diseñar otros iniciadores a partir de estas regiones. Por ejemplo, para diseñar iniciadores para CYP6 se podría utilizar como iniciador forward la región de AGGAKCGTTCGAATCTA entre los nucleótidos 1130-1085 y para el reverse se podría utilizar la región TTCCCAGCCGGTACTGTACTCTCCGGAGCGATTCGAT entre los nucleótidos 1307-1259, en la Figura 19. Para la familia CYP9 las regiones propuestas por Amenyá *et.al.* 2005 son las más adecuadas ya que no hay otras regiones altamente conservadas entre las secuencias de insectos *Culicidae*.

Los iniciadores degenerados se analizaron también en el OligoAnalyzer. Los resultados se muestran en los Cuadros 17-19 para CYP6 y para CYP9 de 20-22. El T_m de los dos pares de iniciadores es cercano entre sí, por lo que se pueden utilizar como pareja para amplificar genes. El contenido GC de todos los iniciadores está dentro del rango recomendable, que es entre 50%-70%. También el largo de los iniciadores está dentro de los valores recomendados. Se analizó las posibles estructuras secundarias, como estructuras de lazo, que podrían formar los iniciadores. Los resultados obtenidos indicaron que todos los iniciadores formarían estructuras de lazo, pero solamente uno está por encima del valor aceptado. Este es el iniciador CYP6 R que forman una estructura de lazo con un $\Delta G = -5.57$ Kcal/mol; esto significa que esta estructura es muy estable y es difícil de romperla. Esta estructura de lazo puede reducir la cantidad de producto obtenido al amplificar los genes, ya que parte del iniciador estará como estructura de lazo, dificultando la unión con el templado. El iniciador rediseñado del CYP9 R mostró un ΔG positivo, lo cual indica que las estructuras de lazo que se pueden formar son poco estables, por lo que es más fácil romperlas. El nucleótido CYP6 F

y CYP9 F presentaron lazos con ΔG negativos, pero por debajo del valor aceptado para que el iniciador aún funcione y no afecte el rendimiento del producto del PCR.

Otras estructuras analizadas fueron la formación de heterodímeros y homodímeros. Los iniciadores CYP6 fueron el par que más homodímeros formó. Los homodímeros formados tienen un ΔG mayor al aceptado. Debido a que los iniciadores se unen con ellos mismos, se reduce la cantidad de oligonucleótidos que se unen al templado, por lo que reduce el rendimiento del PCR. Los otros pares de iniciadores para CYP9 presentaron de 1-3 homodímeros y heterodímeros con ΔG por arriba del valor aceptado. Debido a que estos iniciadores son degenerados, pueden ser diferentes nucleótidos lo cual puede contribuir a la formación de heterodímeros y homodímeros. La formación de estas estructuras se debe tomar en cuenta al momento de monitorear el producto de un PCR ya que éste disminuirá por la formación de estas estructuras.

Es importante mencionar que estos iniciadores degenerados pueden ser utilizados, también en otros vectores de la malaria en Latinoamérica, ya que se observó en los alineamientos que las secuencias están conservadas en los diferentes Anofelinos por lo que es muy probable que esté conservada en otros Anfoelinos cercanos filogenéticamente.

Para determinar si los iniciadores específicos CYP6P9, CYP6P4, CYP6AA4, CYP6P1 de *A. funestus* y CYP6P3 y CYP6M2 de *A. gambiae* se pueden utilizar para amplificar genes homólogos en *A. albimanus*, se realizaron alineamientos de cada iniciador con la base de datos de nucleótidos de Anofelinos en BLAST. En los Cuadros del 16-21 se observan los resultados para cada iniciador forward y reverse. Los iniciadores específicos de *A. funestus* que se podrían utilizar en *A. albimanus* presentarían un alineamiento con algún CYP6 de *A. gambiae* y viceversa; ya que el iniciador permitiría amplificar tanto el CYP6 para el cual fue diseñado así como los homólogos en otras especies de Anofelinos. De todos los iniciadores específicos, solamente el iniciador CYP6P3 de *A. gambiae* y CYP6AA4 de *A. funestus* presentaron un alineamiento con otro CYP de una especie diferente de Anofelinos. El iniciador forward de CYP6P3 presentó un alineamiento con el posible homólogo CYP6P9 de *A. funestus* con un Valor-E = 0.024 y un puntaje máximo de 34.2. También presentó alineamiento con el CYP6P13 de *A. funestus* con el mismo E-valor y puntaje máximo; sin embargo, el iniciador reverse de CYP6P3 no presentó alineamiento con estos dos CYP. Solamente presentó alineamientos con CYP de *A. gambiae* y otras secuencias de este mismo mosquito. Los alineamientos estadísticamente significativos para el iniciador reverse fueron mARN AGAP002865-PA (AgaP_AGAP002865) de *A. gambiae* cepa PEST con un valor-E = 4.00E-04 y mARN AGAP007808-PA (AgaP_AGAP007808) de *A. gambiae* cepa PEST con un Valor-E = 1.5. Los puntajes máximos fueron 40.1 bits y 28.2 bits respectivamente.

Se obtuvieron los mismos resultados para el iniciador CYP6AA4, en donde el CYP de *A. gambiae* con el cual se obtuvo otro alineamiento tuvo un valor-E = 5.4 y un puntaje máximo de 28.2. Estos valores están por debajo de los valores permitidos, por lo que este alineamiento no es estadísticamente significativo. Para el iniciador reverse no se obtuvieron alineamientos con otros CYP. El Valor-E del iniciado reverse para otros genes además del CYP6AA4 fueron 0.092. Los genes con este Valor-E fueron el gen de la proteína de serina producida en respuesta a la infección en *A. gambiae* y Gen de la cutícula específico de la pupa. Debido a estos resultados, el iniciador reverse tampoco se puede utilizar para amplificar genes homólogos en *A. albimanus*.

Estos resultados muestran que probablemente, los iniciadores de estos CYP no amplificarán genes CYP en *A. albimanus* ya que son específicos para el gen para el cual fueron diseñados y no amplifican genes homólogos. Además, los iniciadores fueron diseñados para *A. gambiae* y *A. funestus*, los cuales están cercanos filogenéticamente; por lo que si un iniciador diseñado para *A. gambiae* no puede amplificar genes homólogos en *A. funestus*, tampoco amplificará homólogos en *A. albimanus* que está más alejado filogenéticamente de estos dos Anofelinos. Para los iniciadores CYP6P3 y CYP6AA4 se podría diseñar nuevos iniciadores reverse que permitan amplificar homólogos de otras especies que no sean para la cual fueron diseñados. Otra razón por la cual estos iniciadores puede que no amplifiquen genes CYP de *A. albimanus* es debido a la distancia filogenética que hay entre *A. funestus* y *A. gambiae*. Debido a que estos dos están más cercanos, es más probable que los iniciadores diseñados para una de esta especie puedan amplificar homólogos de la otra especie; pero por encontrarse más distantes de *A. albimanus*, es menos probable que amplifiquen algún gen de esta especie.

Al igual que para los iniciadores degenerados, para los iniciadores específicos se realizó un análisis de cada par en el programa OligoAnalyzer. Los iniciadores CYP6P3 y CYP6M2 diseñados para *A. gambiae*, mostraron valores de Tm, contenido GC y dentro de los valores aceptables, además que fueron los pares que presentaron menor formación de estructuras como heterodímeros, homodímeros y lazo. Mientras que los iniciadores CYP6P9, CYP6P4, CYP6P1 y CYP6AA4 mostraron varias estructuras de homodímeros, heterodímeros y lazos con ΔG por encima de los valores aceptables. Por lo que además que los iniciadores no pueden amplificar genes homólogos, no son adecuados ya que pueden formar estructuras secundarias que son estables y, por lo tanto, difíciles de romper.

La Figura 23 muestra la región donde se unen los iniciadores CYP6P3 y CYP6AA4. Para los dos iniciadores se observa que hay bastante variación entre los diferentes CYP6 de *A. gambiae* y *A. minimus*, y la secuencia del iniciador. Esto muestra que probablemente no

amplificará genes homólogos en *A. albimanus*, ya que al haber gran variabilidad entre especies muy cercanas habrá más variabilidad en especies más lejanas como el caso de *A. albimanus* y los otros tres Anofelinos.

VIII. CONCLUSIONES

Los iniciadores degenerados propuestos por Aménaya *et.al.* 2005 se pueden utilizar para amplificar genes CYP6 y CYP9 de *A. albimanus* ya que los resultados muestran que estos se unen a regiones altamente conservadas en diferentes especies de insectos.

El iniciador CYP9 R fue rediseñado para que pueda unirse a diferentes secuencias de varios insectos. La secuencia del nuevo iniciador degenerado es 5'-AGY GTY TCG SWY ACR ACC ATR TC-3'.

Se validaron los iniciadores degenerados, los cuales tiene las siguientes secuencias: CYP6 forward 5'-TCW SIC TGT ACGAGC TKG C-3', reverse 5'-GGI CCC TCG CCGAACGG-3'; para CYP9 forward 5'-TTYACCGGC AGC AAR ATG CG-3' y reverse 5'-AGY GTY TCG SWY ACR ACC ATR TC-3'.

Los iniciadores degenerados pueden ser utilizados, también en otros vectores de la malaria en Latinoamérica, ya que se observó en los alineamientos que las secuencias están conservadas en los diferentes Anofelinos.

Los pares de iniciadores degenerados analizados en OligoAnalyzer mostraron un Tm compatible, un contenido GC y largo dentro del rango permitido; sin embargo el iniciador CYP6 puede formar estructuras de lazo ya que posee un ΔG estable. Así mismo forma heterodímeros y homodímeros. Esto se debe tomar en cuenta al momento de amplificar genes utilizando estos iniciadores ya que por la formación de estas estructuras se disminuye la cantidad de producto formado.

Los iniciadores específicos de *A. funestus* como CYP6P9, CYP6P1, CYP6P4 y CYPT6M2 de *A. gambiae*, no se pueden utilizar para amplificar genes de *A. albimanus* ya que estos son específicos para los genes que fueron diseñados, por lo que no amplificar ningún homólogo de otra especie de Anofelinos.

El iniciador forward CYP6AA4 de *A. funestus* se puede unir al mRNA de otro CYP de *A. gambiae*, pero el reverse no, por lo que este par de iniciadores no se podrían utilizar para amplificar genes CYP en *A. albimanus* ya que no amplifican genes homólogos de una especie más cercana filogenéticamente. Además que pueden formar estructuras como heterodímeros, homodímeros y lazos que son estables.

El iniciador forward CYP6P3 de *A.gambiae* se puede unir al CYP6P9 de *A. funestus*, pero el reverse no. Al igual que el iniciador CYP6AA4, estos dos iniciadores no amplificarán genes CYP6 de *A. albimanus* ya que no presentaron alineamiento con otra especie de Anofelinos.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar una validación de los iniciadores degenerados para obtener la receta y el programa del reverse transcription PCR y del PCR adecuado para poder amplificar genes CYP6 y CYP9 de *A. albimanus*.

Se recomienda, además de validar los iniciadores degenerados, realizar una secuenciación de los productos de PCR obtenidos para confirmar que los productos obtenidos pertenezcan a la familia CYP6 y CYP9. Los pasos a seguir para la secuenciación de los CYP serían: la clonación de los productos de PCR en un vector de clonación como pGEM-T en *Escherichia coli*. Las bacterias transformadas podrían ser monitoreadas con PCR utilizando iniciadores para Sp6 y T7. Como tamizaje para evitar secuenciar los mismos CYP, se podrían analizar los productos del PCR de la transformación con polimorfismo de una sola hebra. Los clones con patrones únicos se secuenciarían utilizando los iniciadores Sp6 y T7.

Para obtener las secuencias completas de los mARN de los diferentes CYP se podría crear una librería de cADN. Luego se realizaría un tamizaje de la librería identificando las posibles secuencias CYP. Estos insertos se podrían clonar y secuenciar. A partir de las secuencias obtenidas se podría crear un mapa que permita obtener la secuencia entera de un CYP.

X. LITERATURA CITADA

1. Amenia, D.; Koekemoer, L.; Vaughan, A.; Morgan, J.; Brooke, B.; Hunt, R.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Coetzee, M. 2005. *Isolation and sequence analysis of P450 genes from a pyrethroid resistant colony of the major malaria vector Anopheles funestus*. DNA Sequence. 16(6): 437-445.
2. Beach, R. y Córdón-Rosales, C. 1989. *Detoxifying esterases may limit use of pyrethroids for malaria vector control in the Americas*. Parasitology Today. 5(10):326-327.
3. Beach, R.; Brogdon, W.; Castañaza, L.; Córdón-Rosales, C.; Calderón, M. 1989. *Effect of temperature on an enzyme assay to detect fenitrothion resistance in Anopheles albimanus mosquitos*. Bulletin of the World Health Organization. 67(2): 203-208.
4. Bergé, J.; Feyereisen, R.; Amichot, M. 1998. *Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects*. Philosophical Transactions of the Royal Society. 353:1701-1705.
5. Bertone, M. 2008. *Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta: Diptera) based on multiple nuclear genes*. Systematic Entomology 33 :668–687.
6. Brogdon, W.; Beach, R.; Barber, A.; Córdón-Rosales, C. 1992. *A generalized approach to detection of organophosphate resistance in mosquitoes*. Medical and Veterinary Entomology.6: 110-114.
7. Burton, B.; Carter, C.; Oeltmann, T. 2005. *Human Parasitology*. 3ed. Burlington, MA. Elsevier Academic Press. 459p.
8. Córdón-Rosales, C.; Beach, R.; Brodgon, W. 1990. *Field evaluation of methods for estimating carbamate resistance in Anopheles albimanus mosquitos from a microplate assay for insensitive acetylcholinesterase*. Bulletin of the World Health Organization. 68(3): 323-329.

9. Daborn, P.; Yen, J.; Bogwitz, R.; Le Goff, E.; Jeffers, S.; Tijet, N.; Perry, T.; Heckel, D.; Batterham, P.; Feyereisen, R.; Wilson, T.; ffrench-Constant, H. 2002. *A single P450 allele associated with insecticide resistance in Drosophila*. *Science*. 297:2253-2256.
10. Guengerich, P. 1991. *Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes*. *The journal of biological chemistry*. 266. (16): 1019-1022.
11. Guerra, C.A. *et al.* 2008. *The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide*. *PLoS Medicine* 5: e38 and Hay, S.I. *et al.* (2009). *A world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2007*. *PLoS Medicine* 6(3): e1000048.
12. Harbach, R. y Kitching, J. 1998. *Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera)*. *Systematic Entomology*. 23: 327-370.
13. Hemingway, J. y Ranson, H. 2000. *Insecticide Resistance in insect vectors of human disease*. *Annual Reviews of Entomology*. 45: 371-391.
14. Hemingway, J.; Hawkes, N.; McCarroll, L.; Ranson, H. 2004. *The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34: 653-665.
15. Karp, G. 2006. *Biología celular y molecular*. Mc Graw-Hill Interamericana.
16. Karunker, I.; Benting, J.; Lueke, B.; Ponge, T.; Nauen, R.; Roditakis, E.; Vontas, J.; Gorman, K.; Denholm, I.; Morin, S. 2008. *Over-expression of cytochrome P450 CYP6CYM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of Bemisia tabaci*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 634–644.
17. Kiszewski, A.; Mellinger, A.; Spielman, A.; Malaney, P.; Sachs, S.; Sachs, J. 2004. *A global index representing the stability of malaria transmission*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70(5): 486-498.
18. Klug, W.; Cummings, M.; Spencer, C. 2006. *Concepts of Genetics*. Pearson Education Hill 8va. Ed. United States of America.
19. McCart, C. y Constant-ffrench, R. 2008. *Dissecting the insecticide-resistance-associated cytochrome P450 gene CYP6G1*. *Pest Management*. 64: 639-645.

20. McNaught, A. y Wilinson. A. 1997. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2da ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford [Web en línea]. <<http://goldbook.iupac.org> > Formato HTLM [con acceso el 28-04-2009]
21. Merida, A.; Pamieri, M.; Yurrita, M.; Molina, A.; Molina, E.; Black, W. 1999. *Mitochondrial DNA variation among Anopheles albimanus populations*. American Journal of Tropical Medicine and Hyegene. 61(2) pp. 230–239.
22. Mestres, J. 2005. *Structure Conservation in Cytochromes P450. Proteins: structure, function and bioinformatics*. 58: 596-609.
23. Muller.,P.; Warr, E.; Stevenson, B.; Pignatelli, P.; Morgan, J.; Steven, A.; Yawson, E.; Mitchel, S.; Ranson, H.; Hemingway, J.; Pain, M.; Donnelly, M. 2008. *Field-Caught Permethrin-Resistant Anopheles gambiae overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids*. PLoS Genetics. 4(11): e1000286- e1000286.
24. Nelson, D.; Cox, M. 2005. *Lehninger Principles of biochemistry*. 4ta ed. Replika Press Pvt. Ltd. India.
25. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences. 2008. Estados Unidos. [Web en línea]. <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>> Formato HTLM [con acceso el 27-04-2009]
26. Omura, T 1999. Forty Years of cytochrome P450 *Biochemical and biophysical Research Communications* 266: 690-698.
27. Padilla, N. 1997. *The role of Anopheles vestitipennis and A. albimanus in the transmission of malaria in Guatemala*. Thesis. University of Liverpool. 201p.
28. Pang, H.; Tang, J.; Su-Shing, C.; Tao, S. 2005. *Statistical distributions of optimal global alignment scores of random protein sequences*. Bioinformatics. 6:257.
29. Ram, S.; Lakhan, R.; Shakera, R. 2008. *In silico comparison of real-time PCR probes for detection of pathogens*. In Silico Biology 8 (2008) 251–259.
30. Ranson, H.; Nikou, D.; Hutchinson, M.; Wand, X.; Roth, W.; Hemingway, J.; Collins, F. 2002. *Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, Anopheles gambiae*. Insect Molecular Biology. 11(5): 409-418.

31. Rodpradit, P.; Soamrutai, B.; Theeraphap, C.; Bangs, M.; Pornpimol, R. 2005. *Cytochrome P450 genes: molecular cloning and overexpression in a pyrethroid-resistant strain of anopheles minimus mosquito*. Journal of the American Mosquito Control Association. 21(1): 71-79.
32. Rose, R.; Goh, D.; Thompson, D.; Verma, K.; Heckel, D.; Gahan, L.; Roe, R.; Hodgson, E. 1997 *Cytochrome P450 (CYP)9A1: the first member of a new CYP family*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 27: 605-615.
33. Sallum, M.; Schultz, T.; Foster, P.; Aronstein, K.; Wirtz, A.; Wilkersons, C. 2002. *Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences*. Systematic Entomology 27, 361-381.
34. Scott, J. 1999. *Cytochromes P450 and insecticide resistance*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 29: 757-777.
35. Scott, J. y Wen, Z. 2001. *Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg*. Pest Management. 57: 958-967.
36. Scott, J.; Collins, F.; Feyereisen, R. 1994. *Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito Anopheles albimanus*. Biochemical and biophysical research communications 205(2):1452-9.
37. Shen, B.; Dong, H.; Sheng, H.; Tian, L.; Xiu-Lan, L.; Wu, G.; Zhu, C. 2003. *Cytochrome P450 genes expressed in the deltamethrin-susceptible and – resistant strains of Culex pipiens pallens*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 75:19-26.
38. Sina, B. 2002. *Focus on Plasmodium vivax*. Trends in Parasitology. 18 (7): 287-289.
39. Slakwr, J.; Ichardc, R.; Wilkerson, A.; Besansk, O. 2001. *Toward understanding Anophelinae (Diptera: Culicidae) Phylogeny insights from nuclear single copy genes and the weight of evidence*. Systematic Biology. 50(4): 540-555.
40. Strode, C.; Wondji, C.; David, J.; Hawkes, N.; Lumjuan, N.; Nelson, D.; Drane, D.; Karunaratne, P.; Hemingway, J.; Black, W.; Ranson, H. 2008. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 113-123.
41. Werck, D. y Feyereisen, R. 2000. *Cytochrome P450: a success story*. Protein Family review. 1(6): 3003.1-3003.9.

42. Whiting, M. 2001. *Phylogeny of the holometabolous insect orders: molecular evidence*. Zoologica Scripta. 31: 3–15.
43. Wondji, C.; Irving, H.; Morgan, J.; Lobo, N.; Collins, F.; Hunt, R.; Coetzee, M.; Hemingway, J.; Ranson, H. 2009. *Two duplicate P450 genes are associated with pyrethroid resistance in Anopheles funestus, a major malaria vector*. Genome Research. 19(3): 452-459.
44. Wu, D.; Scharf, M.; Neal, J.; Suiter, D.; Bennett, G.; 1998. *Mechanisms of fenvalerate resistance in the German cockroach Blattella germanica (L.)*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 61:53–62.
45. Xianchun, L.; Schuler, M.; Berbaum, M. 2007. *Molecular Mechanism of Resistance*. Annual Review of Entomology. 52: 231-253.
46. Yang, Y.; Chen, S.; Wu, S.; Yue, L.; Wu, Y. 2006. *Constitutive overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with pyrethroid resistance in Helicoverpa armigera*. Department of Entomology College of Plant Protection. 99.(5): 1784-1789.
47. Zaim, M. y Jambulingam, P. 2007. *Global insecticide use for vector borne disease control*. 3ed. World Health Organization. 78p.
48. Zhu, F. y Liu, N. 2008. *Differential Expression of CYP6A5 and CYP6A5v2 in pyrethroid-resistant house flies, Musca domestica*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 67:107–119.

Referencias de Internet

1. Aultman, K.; Dutton, R.; Farlow, R.; Guillet, P.; Hemingway, J.; Horn, K.; Hoppé, M.; Invest, J.; Mardsen, D.; McCaffery, A.; Nauen, R.; Porter, A.; Staetz, C.; Thompson, G.; Wege, P. 2006. *Insecticide Resistance Action Committee (IRAC). Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pest of public health importance*. <<http://www.irc-online.org/Resistance/Mechanisms.asp>> Formato pdf. [con acceso el: 09-03-2009].
2. Centers for Disease control and prevention (CDC). 2004. Malaria en Guatemala. MERTU/G. Atlanta, Estados Unidos. [Web en línea]

- <<http://www.cdc.gov/malaria/cdcactivities/guatemala.htm>>. Formato HTML. [con acceso el: 03-02-2009]
3. Centers for Disease control and prevention (CDC). 2008. Vector Control. Atlanta, Estados Unidos. [Web en línea] en: <http://www.cdc.gov/malaria/control_prevention/vector_control.htm>. Formato HTML. [con acceso el: 03-02-2009]
 4. Centers for Disease control and prevention (CDC). Anopheles Mosquitoes. Biology. 2008. Atlanta, Estados Unidos. [Web en línea] <<http://www.cdc.gov/malaria/biology/mosquito/>>. Formato HTML. [con acceso el: 03-02-2009]
 5. Centers for Disease control and prevention (CDC). Life cycle of malaria. 2004. Atlanta, Estados Unidos. [Web en línea] <<http://www.cdc.gov/Malaria/biology/index.htm>>. Formato HTML. [con acceso el: 05-02-2009]
 6. Centers for Disease control and prevention (CDC). Malaria glossary. 2004. Atlanta, Estados Unidos. [Web en línea] <<http://www.cdc.gov/malaria/glossary.htm>>. Formato HTML. [con acceso el: 27-04-2009].
 7. EMBL-EB. Fecha desconocida. Clustal W. Cambridge, Reino Unido. [Web en línea] en: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>> [con acceso el: 25-03-2009]
 8. EMBL-EB. Fecha desconocida. Help - About Matrices. Cambridge, Reino Unido. [Web en línea] en: <<http://www.ebi.ac.uk/help/matrix.html>> [con acceso el: 20-03-2009]
 9. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Aedes aegypti*. Canada. [Web en línea]< <http://www.itis.gov/citation.html>>. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
 10. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Anopheles albimanus*. Canada. [Web en línea]< <http://www.itis.gov/citation.html>>. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]

11. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Culex quinquefasciatus*. Canada. [Web en línea] < <http://www.itis.gov/citation.html> >. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
12. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Drosophila melanogaster*. Canada. [Web en línea] < <http://www.itis.gov/citation.html> >. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
13. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Helicoverpa armigera*. Canada. [Web en línea] < <http://www.itis.gov/citation.html> >. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
14. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Heliothis virescens*. Canada. [Web en línea] < <http://www.itis.gov/citation.html> >. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
15. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 1996. *Musca Domestica*. Canada. [Web en línea] < <http://www.itis.gov/citation.html> >. Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
16. Korenromp, E.; Bernard, N.; Wardlaw, T.; Yougn, M.; World Health Organization (WHO).; *Roll Back Malaria (RBM)*.; Department and the United Nations Children's Fund (UNICEF). 2005. *World Malaria report 2005.Guatemala*. <<http://www.rbm.who.int/wmr2005/profiles/guatemala.pdf>> Formato pdf [con acceso el: 12-03-2009]
17. Madden, T. 2002; 13-06-2003. The BLAST sequence Analysis Tool. The NCBI Handbook. Maryland, Estados Unidos. [Libro en línea] en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=handbook.chapter.ch16>> [con acceso el 11-03-2009]
18. Merriam-Webster. 2009. Merriam-Webster Dictionary. Massachusetts, Estados Unidos.[Web en línea] <<http://www.merriam-webster.com/>> Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
19. Pan American Health Organization (PAHO). 2007. Guatemala. *An Overview of Regional Health. Health in the Americas. Guatemala*. <http://www.paho.org/hia/archivosvol2/paisesing/Guatemala%20English.pdf>. Formato pdf [con acceso el: 05-02-2009]

20. PREMIER Biosoft International. 2009. *PCR primer design guideline*. California, Estados Unidos. [Web en línea]. http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html. Formato HTML [con acceso el: 28-04-2009].
21. Tree of Life. 2005. Arizona, Estados Unidos [Web en línea] <<http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>> Formato HTML [con acceso el 27-04-2009]
22. World Health Organization (WHO). Regional office for the eastern Mediterranean. Roll Back Malaria 2003. 03-12-2008. *Third Inter-country Meeting of National Malaria Programme Managers. Monitoring of insecticide resistance in malaria vectors*. Lahore, Pakistán. <<http://www.emro.who.int/RBM/Publications/InsecticideResistance.pdf>> Formato pdf. [con acceso el: 09-03-2009]

XI. ANEXOS

A continuación se muestran los alineamientos completos de proteína y mRNA utilizados para los iniciadores degenerados y los iniciadores específicos CYP6P9 y CYP6AA4.

Figura 26. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador Forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Fun: *A. funestus*. Gamb: *A. gambiae*. Min: *A. minimus*. Cx: *Cx. quinquefasciatus*. Dros: *D. melanogaster*. Mus: *M. domestica*.

Fun.	CYP6P1	-----	
	CYP6P9	MELINAVLAAFIFVVSAYVLFIRNKHNYWKDNGFFYAPNPHFLFGHAKGQAQTRHAADIH	60
	CYP6P5	-----	
	CYP6P4	-----	
	CYP6Y1	-----	
	CYP6N2	-----	
	CYP6M1	-----	
	CYP6M8	-----	
	CYP6M7	-----	
	CYP6AA4	-----	
Gamb.	CYP6P3	MELINAVLAAFIFAVSIVYLFIRNKHNYWKDNGFFYAPNPHFLFGHAKGQAQTRHGADIH	60
	CYP6Z1	----MILYTTIGLIVAFVFLALKYVYSYWDQGLPNLRPEIPYGNLRILAQKKESEFNVAI	55
	CYP6P2	MELLTTLTSLLLVALATGLYLFVRRNRYNYWSNRQFPTLPNQKLLFGHVKGVNTERHASYSIS	60
Min.	CYP6P7	MELVTTILSLLFVLASGLYWFRRNRYNYWTNRGFPTVPMQKLLYGHVKGVTNTERHASIIT	60
Cx.	CYP6F1	---MFAWIICAAAPLVVYFLIVYQFSYWKRRGITQLTPSFPFGDLGPFRRQRSSLGVVY	57
Dros.	CYP6G1	-MVLTEVLFVVVAALVALYTWFRNHSYWRKGIPIPTPIIGNTRKVVFKMENSFGMHL	59
	CYP6A2	----MFVLIYLLIAISSLLAYLYHRNFNYWNRGVPDAPHPLYGNMVGFRKRVMDHFF	56
	CYP6A8	-MALTYYILFQVAVALLAILTYIHRKLTYPKRRGIPFVAPHLIRGNMEEELQTKNIHEIF	59
Mus.	CYP6D1	-----MLLLLLLIVVTTLYIFAKLHYTKWERLGFESDKATIPLGSMKAVFHKERPFGLVL	54
Fun.	CYP6P1	-----	
	CYP6P9	LELYKKFKQRRERYVGMSSQFMIPSLVIDPELVKTILVKDFNVFHDHGVFNARDDPLSA	120
	CYP6P5	-----	
	CYP6P4	-----	
	CYP6Y1	-----	
	CYP6N2	-----	
	CYP6M1	-----	
	CYP6M8	-----	
	CYP6M7	-----	
	CYP6AA4	-----	
Gamb.	CYP6P3	QELYRYFKQGERYGGISQFIVPSVLVIDPELAKTILVKDFNVFHDHGVFTNAKDDPLTG	120
	CYP6Z1	NDLYD---RSSERLVGVYLFRRPAILVRDAHLAKRIMVNDFQHFHDRGVVYCNHSDPMSA	112
	CYP6P2	SEIYREFKKRGDAFGGFMMFVIPAUMAIDPEFIKTILVKDFHIFHDRGLFSDPEIDPLSG	120
Min.	CYP6P7	AEIYQQLKRGDSFGGLNVFIIPAVMVVDPELIKTIILVKDFHIFHDRGLFSDPEVDPLSG	120
Cx.	CYP6F1	ADVYRLCKR--LPFVGIYLSLRPMLVVNDPELIKNVLRDFFHDFHDRGLYVNEEKDPLSG	115
Dros.	CYP6G1	SEIYNDPRLKDEAVVGIYSMNKPLIIRDIELIKSILIKDFNRFNRYARCDPHGDPLGY	119
	CYP6A2	YDYNNKYRKSGFPPFVGFYFLHKPAAFIVDTQLAKNILLIKDFSNFADRGQFHNRRDDPLTQ	116
	CYP6A8	QDHYNKFRFSKAPFVGFVFFQSPAFAFVIDLELAKQILIKDFSNFNSKGIIFYNEKDDPISA	119
Mus.	CYP6D1	SDIYD---KCHEKVVGIYLFKPAALLVRDAELARQILTTDFNSFHDHGLYVDEKNDPMSA	111

```

Fun. CYP6P1 -----
CYP6P9 -HLFALEGNPWRLLRQKLTPTFTSGRMKQMFGLWDVALELD----KYMEENYRQPDIE 175
CYP6P5 -----
CYP6P4 -----
CYP6Y1 -----
CYP6N2 -----
CYP6M1 -----
CYP6M6 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 -HLFALEGQPWRLLMRQKLTPTFTSGRMKQMFGLTIRDVGLELE----KCMEQSYNQPEVEM 175
CYP6Z1 -NLFALPGQRWKNLRAKLTPTFTSGQLRHMLPTFLAVGSKLEQYLERLANEKQ---IVDM 168
CYP6P2 -TLFALQKAKWILRQKLTPTFTSGMKQMFATVLEVAERLG----QHVATHTG--QM 173
Min. CYP6P7 -TLFALQKPKWILRQKLTPTFTSGMKQMFATVLEVAERLG----QHVATHTG--QM 173
Cx. CYP6F1 -HLFALGGEQWRHRSKLTPTFTSGRLKEMFTNLVQIG-----RVLQDHVAKRAGEDIEI 169
Dros. CYP6G1 NNLFFVRDAHMKGIRTKLTPVFTSGVKQMYTLMQEIIGKDELELALQRRGEKNSGSFITEI 179
CYP6A2 -HLFNLDGKMKDMRQRLTPTFTSGMKQMFATVLEVAERLG----QHVATHTG--QM 175
CYP6A6 -HLFNLDGAQRLLRNKLSSTFTSGMKMLMYPYVVSVA NEFHTVMHEKVPKNS---VLEI 175
Mus. CYP6D1 -NLFVMEGQSWRTLRLMKLAPSFSSGKLGKMFETVDDVAAKLLNHLNERLKDQSH-VLEI 169

Fun. CYP6P1 -----
CYP6P9 KDVLGRFTTDVIGTCAFGIECNTLKTDPSEFRKYGNKAFEFN---LMIFLKTFLASAYPS 232
CYP6P5 -----
CYP6P4 -----
CYP6Y1 -----
CYP6N2 -----
CYP6M1 -----
CYP6M6 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 KDILGRFTTDVIGTCAFGIECNTLKTDPSEFRKYGNKAFELN---TMIMMKTFLASSYPT 232
CYP6Z1 RDIVSRYVLDVVASVFFGFEANCLHDDDAFRVALRDLNMPD--SFMMNIRTAGVFLCPG 226
CYP6P2 KDVLARYTTDVIPTCAFGIECNTLRNPDSDFLKYGNKVFEQK---VSTMIKILLVLMGRK 230
Min. CYP6P7 KEILVRYTTDVIPTCAFGIECNTLKDPSSEFLKYGNKVLDQK---VSTMIKIIFIMVMRK 232
Cx. CYP6F1 RDVMARYTTDIIASVGFGEIENDSIMEKGNIFREMGTKVFSFD---LKTILRLTSTFTFPK 226
Dros. CYP6G1 KEICAFSTDSIATIAFGIRANSLENPNAEFRNYGRKMFTFT---VARAKDFFVAFFLPK 236
CYP6A2 KELMARFTTDVIGTCRFGIECNTLRTPVSDFRIMGQKVFDM---RHGKLLTMFVFSFPP 232
CYP6A6 RDLVARFTVDVIGTCAFGIQCNSLRDEKAEFLYFGKRSLVDK---RHGTLNMGHMSYPK 232
Mus. CYP6D1 KSILTTYAVDIIIGSVIFGLEIDSFTHPDNEFRVLSDRLLFNPKKSTMLQRFFNLNFCPP 229

```

```

Fun. CYP6P1 -----
CYP6P9 LVRKLRMKITFDVVEQFFLKIIVKETVEYRE SNNIKRND FMNLLLQIKNKGLDDSD---- 288
CYP6P5 -----
CYP6P4 -----
CYP6Y1 -----
CYP6N2 -----
CYP6M1 -----
CYP6M6 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 LVRNLHMKITYNVERFFLDIVKETVDYREANMVKRNDFMNLMQLIKNKGLDDSD---- 288
CYP6Z1 LLKFTGINSLSPPMKKFTTEVISHLHQRETGVVMRKDFIQMLTDLRRKAGSSGE---- 281
CYP6P2 ISSKFTLKITDADVETFFMNLVRETVEYRENNVKNRDNFLNLLLQIKNTGKLWEGE---- 286
Min. CYP6P7 FKSNFVLKITDADVESFFLNLVRETVEYRENNVKNRDNFLNLLMQIKNTGKLWEAE---- 288
Cx. CYP6F1 LNALFGFKFIAQEI DFIMNVRETLEYSNMKVVRKDMMLQLMQLRNSGTVSIIDRW-- 284
Dros. CYP6G1 LVSLMRIQFFTDADFSHFMRSTIGHVMEERERSGLLRNDLIDVLVSLRKEAAAEPSK---- 292
CYP6A2 LASRLRMRMMPEDVHQFFMRLVNDTIALRENFKNRDNFMNLLIELKQKGRVTLDM---- 288
CYP6A6 LARKLGMVRTAPHIQEFYSRIVTETVAVREKEHIKRNDFMDMLELKNQKEMTLEN---- 288
Mus. CYP6D1 LAKLLSRLGAKDPITYRLRDIVKRTIEFREKGVVVKD LLLQFIQLRNTGKISDDNDKLV 289

```

F

```

Fun. CYP6P1 -----WLYELAKNPD IQERLRDELNR 21
CYP6P9 --DGSVKGGEVGMTQRELAQAQVFFLAGFETSSTTQSFC LYELAKNPD IQERLRQEI 346
CYP6P5 -----ELAAQVLIFFLAGFETSSTTQSFC LYELAKNPD IQERLRDEITR 44
CYP6P4 -----LAKNPD IQERLRREEIER 17
CYP6Y1 -----DFS LYELALQDQDKRRCVKE 23
CYP6N2 -----ALNEIQQRARQCVD 16
CYP6M1 -----LNPEIQEGRKCVKE 15
CYP6M6 -----LYELALNPEVQEQGRKCVRE 20
CYP6M7 -----LYELALNQDQDKRRCVKE 20
CYP6AA4 -----LYELANND IQERVRAEVL 20
Gamb. CYP6P3 --DGSVKGGEVGMTQRELAQAQVFFLAGFETSSTTQSFC LYELAKNPD IQERLRREEINR 346
CYP6Z1 -----ETLTDQAQCAANVFLFYGAGADTSTGTITFT LHELTHNAEAMAKLQREVD 331
CYP6P2 ---EDHIGKGEVGMTQRELAQAQVFFLAGFETSSTTMMFC LYELAKHPD IQERLRREEIER 344
Min. CYP6P7 ---EEHVKGGEVGMTQRELAQAQVFFLAGFETSSTTMMFC LYELAKNSELQERLRKEINR 346
Cx. CYP6F1 --DIEVSTNKKLSLEQVTAHAFVFFIAAYETSSTTISFC LFELARNPEIQKQVQEQIDQ 342
Dros. CYP6G1 --PHYAK-----NQDFLVAQAGVFFTAGFETSSTTMSFALYEMAKHPMEMQKRLREINE 344
CYP6A2 --GEVIEGMDI---GELAAQVFFVYVAGFETSSTTMSYC LYELAQND IQDRLRNEIQT 342
CYP6A6 --GDVVRGLTM---EEVLAQAQVFFVYVAGFETSSTTMSFALYELAKNPD IQDKVRAEVEE 342
Mus. CYP6D1 HDVESTAENLKAMSIDMIASNSFLFYIAGSETTAATTSFT LYELAMYPEILKKAQSEVD 349

```

LYELAK : : :

```

Fun. CYP6P1      AIETNDG---ELTYEVVMGQEYLGQVVMNETLRKYPPLETTLRVTA-----QDYRIP-GT 71
CYP6P9          AIEENDG---QVTYDVAMNIQYLDVNETLRKYPPVESLSRVPS-----VDYVIP-GT 396
CYP6P5          AIDDNGG---EVTYDVAMNIQYLDVNETLRKYPPVETLTRKPA-----HDYVIP-GT 94
CYP6P4          GVEDHGG---QVTYEVMMNMNQLDQVNETLRKYPPVIESLSRVPI-----RDYTIP-GT 67
CYP6Y1          TLQYGG---KLSYEAVSDMSYLDQCINETLRKHPPVAILERNAD-----KDYRLP-DS 73
CYP6M2          AVKKG---GLSYEALMDMPYIDQRINESLRKYPPGANLIRQVS-----QDYRVP-GT 65
CYP6M1          ILEKNG---EMTYEAILDMKYLDQILNETLRKYPPVPHFRMTT-----QDYRVP-NT 65
CYP6M8          VLKKGNG---EMSYDAVDMKYLDQILNESLRKYPPVPHFRVAS-----KDYQVP-GT 70
CYP6M7          VLERHNG---ELTYDAVMMEMHYLDQIPKESLRKYPPVPHFRVTS-----KEYQVP-GT 70
CYP6AA4        KLKLDN---QITYDALKEMTYLDQVNETLRMYPPVQLIRVAT-----QPYAVA-GT 70
Gamb. CYP6P3    AIAENG---EVTYDVMMNIKYLDNVIDETLRKYPPVESLTRVPS-----VDYLIP-GT 396
CYP6Z1        MNERH---HGEITYDNITGMKYLDLCVKETLRIYPALAVLMRECT-----IDYKVP-DS 381
CYP6P2        AVEENG---ELTYDVVMGTEYLNWVDETLRKYPPLETVTRAPE-----HDYTVP-GT 394
Min. CYP6P7    ALEANG---ELTYDVVMGIEYLMKVVDLTLRKYPPLESITRAPE-----QDYTIP-GT 396
Cx. CYP6F1     VLASHNG---EITYDNINEMKYLENCIDETLRKYPPVFFLNRPCS-----KDYKIP-GT 392
Dros. CYP6G1   ALVEGG---SLSYEKIQSLEYLAMVWVDEVLRYMYPVLPFLDREYESVEGQPDLSLKPFF 400
CYP6A2        VLEEQEG---QLTYESIKAMTYLNQVISETLRLYTLVPHLERKAL-----NDYVVPGE 393
CYP6A8        VIEQHDQ---NFTYECTKDLKYNQVLDLTLRLYTLVPLNDRMAA-----KRYVVP-GHP 393
Mus. CYP6D1    CLQRHGLKPGRLTYEAIQDMKYLDLCVMETTRKYPPGLPFLNRKCT-----QDFQVP-DT 403
:
: .: * : * * : * R :

Fun. CYP6P1      DHVIPRNVGVQVPVFAIHRDPEHYDPPECDFPDRFSAEECKRRLPYTFLPFGEGP----- 126
CYP6P9          KHVIPKRTLQVLPVHAIQHDPEHYDPERFDPDRFSPREEVKRHPFTFLPFGEGPRVCIG 456
CYP6P5          KHIIPGAIQVPIYAIQRPDHFDPERFDPDRFTEPEVKRHPYVYI----- 143
CYP6P4          KHVIPKDTFIQIPVYAIQRDPFYEPDQFNPDRFLPEGVKRHPYVYI----- 117
CYP6Y1          GLLLRGQKIMIPYAMHHDSTHFDPPEQYRPERFSPREEVAKRDPYCYLPPFGDGRP----- 129
CYP6M2          DVTFFKGMNVMIPVYAIHHDPEHYDPERYDPDRFAADASEARKPYSFJLPFGEGP----- 120
CYP6M1          DSVIEAGTRVLIPIFAIQRDSDFPEPEKFDPERFSPREEAKRHPFAMI----- 114
CYP6M8          KSVLEAGTAVMVPVHAIHHDPAVFPDPERYDPERFSPPEQAKRHPYAWLPFGEGP----- 125
CYP6M7          KTVLEAGTSVMVPVYAIHHDPEHFNPDLFDPRFTEPEAKRHPYAWLPFGEGP----- 125
CYP6AA4        NVTLDRDTMLMVPYAIHHDATYYPDKRFDPRFATDALHSRHTAFLPFGEGP----- 125
Gamb. CYP6P3    KHVIPKRTLQVPIYAIQRDPDHYDPERFNPDRFLPEEVKCRHPFTFLPFGEGPRICIG 456
CYP6Z1        DTVIRKGTQMIPLLLGISMMEKYFPEPELYSPERFDEA-TKNYDADAYLPFGAGPRNCIG 440
CYP6P2        AHVIPKGTMIQIPYALHHDQYYPDPERFDPERFRPEVAMARPAVYVMPFGEGPRICIG 454
Min. CYP6P7    KHVIPKGTMIQIPYALHHDPEYYPEPERFDPERFQPEVAMARPYVYVMPFGEGPRICIG 456
Cx. CYP6F1     DTTIEKGTSLVIPVLGLHRDPDHYPEPDRFIPERFSN--FEDISTKPYLPFGAGPRNCIG 450
Dros. CYP6G1   DYTLENGTVPVFIYALHHDPKYWNTPSQDFPERFSPANRKNIVAMAYQPFSGPHNCIG 460
CYP6A2        KLVIEKGTQVILPACAYHRDEDLYPNPETFDPERFSPPEKVAARESVEWLPFGDGRNCIG 453
CYP6A8        NFVIEAGQSVIIPSSAIHHDPSIYYPEFRPERFSPPEESAGRPSVAMLPFGDGRNCIG 453
Mus. CYP6D1    KLTIKGTGIIISLLGIHRDPQYFPQPEDYRPERFADE-SKDYDPAAYMPFGEGPRHCIA 462
:
: .: . : : : * : * : * :
:
: PFGEGP

```

```

Fun. CYP6P1      -----
CYP6P9          LRFQVMQTKVGLITLLRQFRFSPARTPDCVKFDPKMIILSPIAGNYLKVLEK----- 509
CYP6P5          -----
CYP6P4          -----
CYP6Y1          -----
CYP6M2          -----
CYP6M1          -----
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4        -----
Gamb. CYP6P3    LRFGLMQTKVGLITLLRQFRFSPARTPERVEYDPKMITIAPKAGNYLKVLEK----- 509
CYP6Z1        LRQGLLLSKIALVMMLSRFNFSATIPRKKIFEP-VSITLAPKGLPMRIENRVKH----- 494
CYP6P2        LRFQVMQTKVGLITLLRQFRFSPTEQTPDRIRFMPNVFVLSPDSGNYLKVLEK----- 507
Min. CYP6P7    MRFQVMQTKVGLITLLRQFRFSPAKTPTETIRFMPNVFVLSPDRGNYLHVKEI----- 509
Cx. CYP6F1     LRLGKLTQKAGLVMMLSKFNWRLADETYASKEALDARSVLMVPGGKIVSISERRAS-- 508
Dros. CYP6G1   SRIGLLQSKLGLVSLKMHSVRNCEATMKFDPKGFVLQADGGIHLIVNDRLYDQSA 520
CYP6A2        MRFQVMQARIGLAQIISFRVSVCDTTEIPLKYSVMSIVLGTVGGIYLRVERI----- 506
CYP6A8        LRFQVMQARIGLALLIRNFKFTSCKTPNPLVYDPKSFLVQKDGIIYLVKVEIV----- 506
Mus. CYP6D1    QRMGMNSKVALAKILANFNIQMPRQVEVEFKFHSAPVLPVVMGLNVGLSKRW----- 515

Fun. CYP6P1      ----
CYP6P9          ----
CYP6P5          ----
CYP6P4          ----
CYP6Y1          ----
CYP6M2          ----
CYP6M1          ----
CYP6M8          ----
CYP6M7          ----
CYP6AA4        ----
Gamb. CYP6P3    ----
CYP6Z1        ----
CYP6P2        ----
Min. CYP6P7    ----
Cx. CYP6F1     ----
Dros. CYP6G1   PSLQ 524
CYP6A2        ----
CYP6A8        ----
Mus. CYP6D1    ----

```

Figura 27. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP6 de insectos de la familia Culicidae

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador Forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Fun: A. funestus. Gamb: A. gambiae. Min: A. minimus. Cx: Cx. quinquefasciatus

```

Fun. CYP6P1 -----
CYP6P9 MELINAVLAAFIFVVSAYVLFIRNKHNYWKDNGFPYAPNPHFLFGHAKGQAQTRHAADIH 60
CYP6P5 -----
CYP6P4 -----
CYP6Y1 -----
CYP6N2 -----
CYP6M1 -----
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 MELINAVLAAFIFAVSIVYLFIRNKHNYWKDNGFPYAPNPHFLFGHAKGQAQTRHGADIH 60
CYP6Z1 -----MILYTIGLIVAFVFLALKYVYSYWDQRQLPMLRPEIPYGNLRILAQKKESEFNVAI 55
CYP6P2 MELLTTLTLLVALATGLYLFVRNRYNYWSNRQFPTLPNQKLLFGHVKGVNTERHASYIS 60
Min. CYP6P7 MELVTTILSLLFVLASGLYWFLRNRYNYWTNRGFPTVPNQKLLYGHVKGVTNERHASYIT 60
Cx. CYP6F1 ---MFAWIICAAADVPLVYFLIVYQFSYWKRRGITQLTPSFFPGDLGPFQRSSSLGVVY 57

Fun. CYP6P1 -----
CYP6P9 LELYKFKQRERYVGMISQFMIPSLLVIDPELVKTIILVKDFNVFHDHGVFTNARDPLSA 120
CYP6P5 -----
CYP6P4 -----
CYP6Y1 -----
CYP6N2 -----
CYP6M1 -----
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 QELYRYFKQRGERYGGISQFIVPSVLVIDPELAKTILVKDFNVFHDHGVFTNAKDDPLTG 120
CYP6Z1 NDLYD---RSSERLVGVYLFRRPAILVRDAHLAKRIMVNDQHFHDRGVYCNEHSDPMSA 112
CYP6P2 SEIYREFKKRGDAFGGFNMVFIPAVMAIDPEFIKTIILVKDFHIFHDRGLFSDPEIDPLSG 120
Min. CYP6P7 AEIYQQLKRGDSFGGLNVFLIPAVMVVDPELIKTIILVKDFHIFHDRGLFSDPEVDPLSG 120
Cx. CYP6F1 ADVYRLCKRLPFVG--IYLSLRPHLVVMDPELIKNVLVRDFHFDHGRGLVYVNEEKDPLSG 115

```

Fun. CYP6P1	-----	
CYP6P9	HLFALEGQWRLMRQKLTPTFTSGRMKQMFGLWDVALELDKYME-ENYRQPDIEMKDVL	179
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	HLFALEGQWRLMRQKLTPTFTSGRMKQMFGLTIRVGLGLELEKCMEE-QSYNQPEVEMKDIL	179
CYP6Z1	MLFALPGQRWKNLRAKLTPTFTSGQLRHMLPTFLAVGSKLEQYLERLANEKQIVDMRDIV	172
CYP6P2	TLFALQGWKILRQKLTPTFTSGRMKQMFATVLEVAERLQGHVA-THTG--QMEMKDVL	177
Min. CYP6P7	TLFALQGWKILRQKLTPTFTSGRMKQMFATVLEVAERLQGHVA-THTG--QMEMKDVL	179
Cx. CYP6F1	HLFALGGEQWRHRSKLTPTFTSGRLKEMFTNLVQIG-RVLQDHV-AKRAGEDIEIRDVM	173
Fun. CYP6P1	-----	
CYP6P9	GRFTTDVIGTCAFGIECNTLTKTPDSEFRKYGNKAFEFN-LMIFLKTFLASAYPSLVRKLR	238
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	GRFTTDVIGTCAFGIECNTLTKTPDSEFRKYGNKAFELN-TMIMMKTFLASSYPTLVRNLH	238
CYP6Z1	SRVYLDVVASVFFGFANCLHDPDDAFRVALRDLNMPDSFMNNIRTAGVFLCPGLLKFTG	232
CYP6P2	ARYTTDVIPTCAFGIECNTLRNPDSDFLKYGNKVFEQK-VSTMIKIILVLMGRKISSKFT	236
Min. CYP6P7	VRYYTTDVIPTCAFGIECNTLTKDSDSEFLKYGNKVLQDK-VSTMIKIIFIMVMRKFKNFV	238
Cx. CYP6F1	ARYTTDIIASVGFGEIENDSINEKGNIFREMGTQVFSFD-LKTILRLTSTFTFKLNLALFG	232
Fun. CYP6P1	-----	
CYP6P9	MKITFDDVEQFFLKIIVKETEVEYRESNNIKRNDFMNLLLQIKNKGKLDSDDGSSVGKGEVG	298
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	MKITDADVETFFMNLVRETVEYRERNVVKRNDFLNLLLQIKNTGKLVWEGEEDHIGKGEVG	296
CYP6Z1	INSLSPPMKKFTTEVISSHLHQRETGVVVRKDFIQMLTDLRRKAG-----SSGE	281
CYP6P2	LKITDADVESFFLNLVRETVEYRERNVVKRNDFLNLLLQIKNTGKLVWEGEEDHIGKGEVG	296
Min. CYP6P7	LKITDADVESFFLNLVRETVEYRERNVVKRNDFLNLLLQIKNTGKLVWEGEEDHIGKGEVG	298
Cx. CYP6F1	FKFIAQEIIEFIMNVRETLEYSNKVVRKMMQLLMLQRNSGTVSIDDRWDIEVSTNK	292
Fun. CYP6P1	-----	
CYP6P9	-----	
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	-----	
CYP6Z1	-----	
CYP6P2	-----	
Min. CYP6P7	-----	
Cx. CYP6F1	-----	
Fun. CYP6P1	-----	
CYP6P9	--MTQRELAAQAFVFFLAGFETSSTTQSFC	356
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	--MTQRELAAQAFVFFLAGFETSSTTQSFC	356
CYP6Z1	ETLTDAAQCAANVFLFYGAGADTSTGTITFTLHELTHNAEAMAKLQREVDEMMERHNGEIT	341
CYP6P2	--MTMNELAAQVFIFFLAGFETSSTTMMNFC	354
Min. CYP6P7	--MTQRELAAQVFIFFLAGFETSSTTMMNFC	356
Cx. CYP6F1	KKLSLEQVTAHAFVFFIAAYETSSTTISFC	352

F

LYELAK

```

-----WLYELAKNPDIQERLRDELNRAIETNDGELT 31
--MTQRELAAQAFVFFLAGFETSSTTQSFCLYELAKNPDIQERLRQEIINQAIIEENDGGQVT 356
-----ELAAQVLIFFLAGFETSSTTQSFCLYELAKNPDIQERLRDEITRAIDDDNGGEVT 54
-----LAKNPDIQERLRREEIERGVEDHGGQVT 27
-----DFSLYELAKQDVQDKARQCVKQKTLQKYGGKLS 33
-----ALNEQIQRRARQCVLDAVKKHG-GLS 25
-----LNPEIQEKGRKCVKEILEKRNEMT 25
-----LYELALNPEVQEQGRKCVREVLEKKNHNGEMS 30
-----LYELALNQAQDKGRRCVKEVLERHNGELT 30
-----LYELANNPDIQERVRAEVLEKLLKLDNQIT 30
--MTQRELAAQAFVFFLAGFETSSTTQSFCLYELAKNPDIQERLRREEINRAIENGGEVT 356
ETLTDAAQCAANVFLFYGAGADTSTGTITFTLHELTHNAEAMAKLQREVDEMMERHNGEIT 341
--MTMNELAAQVFIFFLAGFETSSTTMMNFCLYELAKNPDIQERLRREEIERAVEENGGEIT 354
--MTQRELAAQVFIFFLAGFETSSTTMMNFCLYELAKNSELQERLRKEINRALEANGGELT 356
KKLSLEQVTAHAFVFFIAAYETSSTTISFCLELARNPEIQKQVQEQEIDQVLAASHNGEIT 352

```

```

Fun. CYP6P1      YEVMHQEYLGQVNETLRKYPPLETTLRVTAQDYRIPGTDHVI PRNVGVQVPPVFAIHRD 91
CYP6P9          YDVAMNIQYLDVNETLRKYPPVESLSRVP SVDYVYIPGTKHVLPKRTL VQIPVHAIQHD 416
CYP6P5          YDVAMNIQYLDVNETLRKYPPVETLTRKPAHDYVYIPGTKHIIPEGAI VQIPIYAIQRD 114
CYP6P4          YEMVMNQYLDVNETLRKYPPIESLSRVP I RDYTI PGTKHVIPKDTFI QIPVYAIQRD 87
CYP6Y1          YEAVSDMSYLDQCINETLRKHPPVA I LERNADKDYRLPD SGLLRGQKIM IPIYAMHHD 93
CYP6N2          YEALMDMPYIDQRINESLRKYPPGANLIRQV SQDYRVPGTDVTFPKGMNVM I P VYAIHHD 85
CYP6M1          YEALDMKYLDQILNETLRKYPPVPMHFRMTTQDYRV PNTDSVIEAGTRVLIPIFAIQRD 85
CYP6M8          YDAVDMKYLDQILNESLRKYPPVPHFRVASKDYQVPGTKSVLEAGTAVMVPVHAIHHD 90
CYP6M7          YDAVMEMHYLDQIPKESLRKYPPVPHFRFTTSKEYQVPGTKTVLEAGT SVMVPVYAIHRD 90
CYP6AA4        YDALKEMTYLDQVNETLRMYPPVPLIRVATQPYAVAGTMVTLDRD TMLMWPYIYAIHHD 90
Gamb. CYP6P3    YDVMNMIKYLDNVIDETLRKYPPVESLTRVPSVDYLI PGTKHVIPKRTL VQIPAYAIQRD 416
CYP6Z1          YDNITGMKYLDLCVKETLRIYPALAVLMRECTIDYKVPDSDTVIRKGTQMI I P LIGISMN 401
CYP6P2          YDVMGTEYLNWVDETLRKYPPLETVTRAPEHDYTVPGTAHVIPKGTMI QIPIYALHHD 414
Min. CYP6P7    YDVMGIEYLNKVVDETLRKYPPLESITRAPEQDYTI PGTKHVIPKGTMVQIPIYALHHD 416
Cx. CYP6F1     YDNINEMKYLENCIDETLRKYPAV PFLMRECSKDYKIPGTDTTIEKGTSLV I PVLGLHRD 412

```

*: * : .*:** :*. * R * :.: : : : * : :

```

Fun. CYP6P1      PEHYDPPECDFPDRFSAEECKRRLPYTFLPFGE GP|----- 126
CYP6P9          PEHYDPERFD PDRFSP EEVKRRHPFTFLPFGE GP|RVCI GLRFGVMQTKVGLITLLRKFR 476
CYP6P5          PDHFPDPERFD PDRFTP EEVKRRHPYVYL|----- 143
CYP6P4          PEFYPEPDQFNPDRFLPEGVKQRHPYVFLP|----- 117
CYP6Y1          STHFPDPEQYRPERFSP EEVAKRDPYCYL PFGDGP|----- 129
CYP6N2          PEHYDPERYD PDRFAADASEARKPYSFI PFGEGP|----- 120
CYP6M1          SDIFPEPEKFDPERFSP EEEAKRHPFANI|----- 114
CYP6M8          PAVFPDPERYDPERFSP EQEAKRHPYAWT PFGEGP|----- 125
CYP6M7          PEHFPMPDLFD PDRFTP EEEAKRHPYAWT PFGEGP|----- 125
CYP6AA4        ATIYPDKRFD PDRFATDALHSRHTHAFLPFGEGP|----- 125
Gamb. CYP6P3    PDHYDPERFNPDRFLPEEVKRRHPFTFI PFGEGP|RICIGLRFGLMQTKVGLITLLRKFR 476
CYP6Z1          EKYPPEPELYSPERFDEATKNYD-ADAYY PFGAGP|RNCIGLRQGLLSKIALVMMLSRFN 460
CYP6P2          AQYYPDPERFDPERFRPEVANARPAYVYMP PFGEGP|RICIGLRFGLMQTKVGLITLLRQFR 474
Min. CYP6P7    PEYYPEPERFDPERFQPEVANARPPYVYMP PFGEGP|RICIGMRFGMMQTKVGLITLLRQFR 476
Cx. CYP6F1     PDHYPEPDRFI PERFSN--FEDISTKPYL PFGAGP|RNCIGLRLGKQLQTKAGLVMLSKFN 470

```

:*:. : *:** . : PFGEGP

```

Fun. CYP6P1      -----
CYP6P9          FSPSARTPDCVKFDPKMIILSPIAGNYLKVEKL----- 509
CYP6P5          -----
CYP6P4          -----
CYP6Y1          -----
CYP6N2          -----
CYP6M1          -----
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4        -----
Gamb. CYP6P3    FSPSARTPERVEYD PKMITIAPKAGNYLKVEKL----- 509
CYP6Z1          FS--ATIPRKIKFEPV SITLAPKGG LPMRIENRVKH-- 494
CYP6P2          FSPTEQTPDRIRFMPNVFVLS PDSGNYLEVEKL----- 507
Min. CYP6P7    FSPTAKTPETIRFMPNVFILSPDRGNYLHVEKI----- 509
Cx. CYP6F1     VRLADETYASKE LALDARSVVLMPVGGIKVSI SERRAS 508

```

Figura 28. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. **F:** región a partir de la cual se diseñó el iniciador Forward. **R:** región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. **Fun:** *A. funestus*. **Gamb:** *A. gambiae*. **Cx:** *Cx. quinquefasciatus*. **Aed:** *Ae. aegypti*. **Dros:** *D. melanogaster*. **Helio:** *Heliothis virescens*.

Fun. CYP9L4	-----	
CYP9K1fun	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1gam	-----	
CYP9L1	--MEINLMYVIGIVSVLVALYVYLTHNNDFFKKYPIPCLPVEPLFGSSRQFLKKISFSE	58
Cx. CYP9C1Cul	--MVVALLITLALPALLLYLLYRWSIATYDYFERRAVPFKPVPLFGNLWPLFLAGKTTGVE	59
CYP9B2	--MTSLEWLLLLVPAAIYLFYRWSVATFDYFEKRGVPFVKPVPLFGGNWFFSGKMHMVD	58
CYP9B1Cul	--MQIDVAYLCAGTLIAALIYYLLTKSHDYFHNKPIPSMAVTPFLGSTGRMLKCCSFPD	58
Aed. CP9J1	MVEVNI FSALAVGAVILLLYHYIAKKYHYFLTKPIPCIKPTFLLG-IFDMVVLKRVELVF	59
CYP9J2	MVEVNI FSALAVGAVILLLYHYIAKKYHYFLTKPIPCIKPTFLLG-IFDMVVLKRVELVF	59
Dros. CYP9B1dro	--MSFVEICLVLATIGLLLFKWSTGTFFKAFEGRNLYFEKPYFPLGNMAASALQ-KASFQK	57
CYP9C1dro	--MVFVELSIFVAFIGLLLKWSVYTFGYFSKRGVAHEKPIPLGNIPWSVLMGKESYIK	58
CYP9B2dro	--MALIEICLALVVVIGLYLIYKWSSTATFKTFEERKLYFEKPYFVGNMAAAAALQ-KSSFQR	57
Helio. CYP9A1V2	-----MILLTLWLVVITAVLLYFRSVYSQLSKQGVNHLPTIPVFGNLMVMVMKQEHFVD	55
Fun. CYP9L4	-----	
CYP9K1fun	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1gam	-----D	1
CYP9L1	FVRSNYERFPNAKMYGMFEMFTPMFVIRDPELIKQITVKDFDHFIFNHRPLMKADNSNMT	118
Cx. CYP9C1Cul	SASAGYWQFPEARFSGFFNFRRPGYLVHDLDLLKRITIKDFD---HFVDHSFNVSPVD	115
CYP9B2	AGSLGYEMFPDSRFSGFFAFRKPGLIHDPELVKQITIKDFD---HFADHTNVVPIEAD	114
CYP9B1Cul	FIESIYNKYSGARVFGFLDTMMPMFVLRDPELIKLIKIDFEYFIDHRPVFGASDIEHPN	118
Aed. CP9J1	GSKLLNSYPDAKIIIGYYELTKPTYMVRDPEMIKKIAIKDFDSFTDRTPVFGDAVPADSL	119
CYP9J2	GSKLLNSYPDAKIIIGYYELTKPTYMVRDPEMIKKIAIKDFDSFTDRTPVFGDAVPADSL	119
Dros. CYP9B1dro	QISEFYNRTRHHKLVGLFNLRTPMIQINDQLIKKICVKDFDHFPHQTLNIP---NERL	114
CYP9C1dro	HSIDLHLRLKQHKVYGVFNLRDPLYLSDPELIRQVGIKNFDTFNHRKGITGEGFNDTSV	118
CYP9B2dro	QLTEFYERTRQHKLVGFFNMRTPMITLNDPELIKVCVKDFDHFPHQPFITS---NDRL	114
Helio. CYP9A1V2	TLGRCVKAFDDDKIVGHYDMVSPILVWLDVDTVKRITVKDFEHFVDRR-----SFTSSFD	110

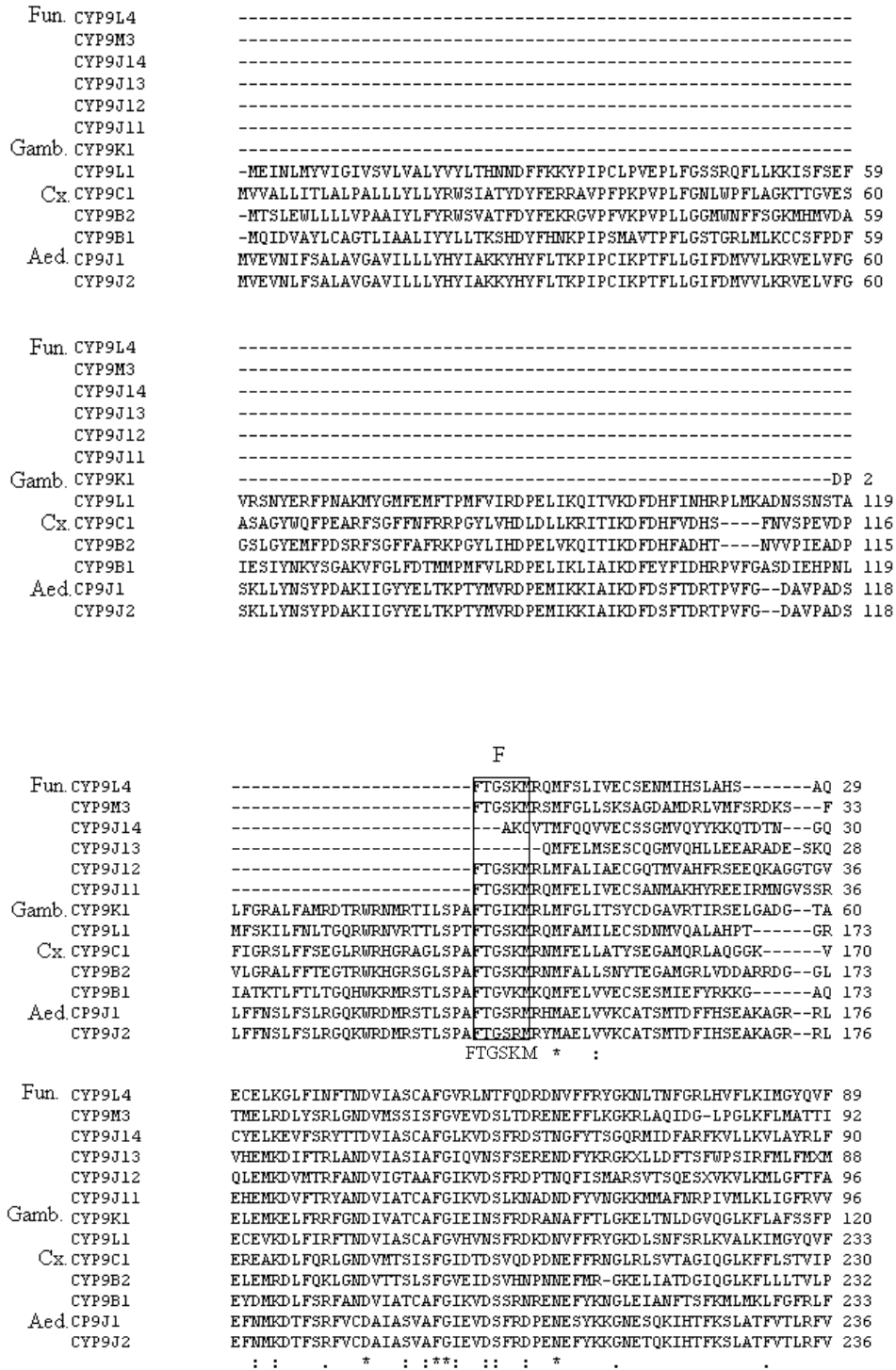
		F	
Fun.	CYP9L4	-----FTGSKM	QMFSLIVECSENMIHSLAHS----- 27
	CYP9K1fun	-----	-----
	CYP9M3	-----FTGSKM	RMFGLLSKSGDAMDRLVMFSR-DKS-- 32
	CYP9J14	-----	---AKCVTMFQQVVVCSSSGMVQYYKQTDTN--- 28
	CYP9J13	-----	-----QMFELMSESCQGMVQHLLEEARADE--S 26
	CYP9J12	-----FTGSKM	RLMFALIAECGQTMVAHFRSEEQKAGG-T 34
	CYP9J11	-----FTGSKM	QMFELIVECSANMAKHVREIRMMGV-S 34
Gamb.	CYP9K1gam	PLFGRALFAMRDRWRMMRTILSPA	FTGIKMLMFGLITSYCDGAVRTIRSELGADGT-- 59
	CYP9L1	AMFSKILFNLTGQRWRNVRTTLLSPT	FTGSKM
Cx.	CYP9C1Cul	PFIGRSLFFSEGLRWRHGRAGLSPA	FTGSKM
	CYP9B2	PVLGRALFFTEGTRWKHGRSGLSPA	FTGSKM
	CYP9B1Cul	LIATKTLFLLTGQHWKMRSTLSPA	FTGVKMKQMFELVVECSSESMIEFYRKKG-- 171
Aed.	CP9J1	FFN--SLFSLRGQKWRDMRSTLSPA	FTGSRMRHMAELVVKCATSMTDFHSEAKAG---R 174
	CYP9J2	FFN--SLFSLRGQKWRDMRSTLSPA	FTGSRMRVMAELVVKCATSMTDFHSEAKAG---R 174
Dros.	CYP9B1Dro	VND--MLNVMDRQHWMMRSTLTPV	FTSAKMRMMFTLMNESFAQCLEHLKSSQPIAAGEN 172
	CYP9C1Dro	ISK--SLLSLDRRRWKQMRSTLTPT	FTSLKIRQMFELIHFCNVEAVDFVQRQLDAG---- 172
	CYP9B2Dro	FND--MLSVMRDQRWKHMRNTLTPV	FTAAKR--NMFTLMNESFAECLQHLDSSSKTLPGRK 171
Helio.	CYP9A1V2	PIFGRGLLLHGDWKAAMRSTMSPA	FTSSKMLMVPFMEEIALEMIRVLRGKIKD SGK-P 169
		FTGSKM	
Fun.	CYP9L4	AQCECEKGLFINFTNDVIASCAFGVRLNTFQDRDNVFFRYGKMLTMFGRHLHVFLKIMGYQ	87
	CYP9K1fun	-----	-----
	CYP9M3	-FTMELRDLYSRLGNDVMSISFGVEVDSLTDRENEFFLKGRKLAQIDGLPGLKFLMATT	91
	CYP9J14	GQCYELKEVFSRYTTDVIASCAFGKVDVSRFDSTNGFYTSGQRMIDFARFKVLLKVLAYR	88
	CYP9J13	KQVHEMKDIFTRLANDVIASIAFGIQVNSFSERENDFYKRGKXLLDFTSFWSIRFMLFM	86
	CYP9J12	GVQLEMKDVHTRFANDVIGTAAFGIKVDVSRFDPTNQFISMARSVTSQESXVKVLMKLGFT	94
	CYP9J11	SREHEMKDVFTRYANDVIATCAFQIKVDVSLKNADNDFYVNGKMMAFNRPVIMLKLIGFR	94
Gamb.	CYP9K1gam	-AELEMKELFRFRGNDIVATCAFQIEINFRDRANAFFTLGKELTNLDGVQGLKFLAFSS	118
	CYP9L1	GRECEVKDLFIRFTNDVIASCAFGVHVNSFRDKDNVFFRYGKDLNMFSRRLKVALKIMGYQ	231
Cx.	CYP9C1Cul	-VEREAKDLFQRLGNDVMTSISFGIDTDSVQDPDNEFFRNGRLSVTAGIQGLKFFLSTV	228
	CYP9B2	-LELEMRDLFQKLGNDVTTSLSGVEIDSVHNFNNEFMR-GKELIATDGIQGLKFLLLTV	230
Aed.	CYP9B1Cul	AQEYDMKDLFSRFANDVIATCAFQIKVDVSRNRENEFYKNGLEIANFTSFKMLMKLFGFR	231
	CP9J1	RLEFNMKDTFSRFVCDALASVAFQIEVDVSRDPENEVYKKGNEVSKIHFTFKSLATFVTLR	234
	CYP9J2	RLEFNMKDTFSRFVCDALASVAFQIEVDVSRDPENEVYKKGNETQKIHFTFKSLATFVTLR	234
Dros.	CYP9B1Dro	AFELDMKVLCKNLSNDVIATTAFLGLKVNVSFDDPENEFHTIGKTLAFSRGLP-FLKFMHCL	231
	CYP9C1Dro	TSELEKDFPRTYNDVIATAAFGIQVNSFKDPNNEFFSIGQRISEFTFWG-GLKVMLYI	231
	CYP9B2Dro	GFEVDMKVMCNKLSNDVIATTAFLGLKVNVSVDNPKNEFYEIG-QLVFSRGLQ-FFFMLST	229
Helio.	CYP9A1V2	YIDVEAKSVMTMYANDVIASCAFGVNVNS-QASDHEFVNVNSQAITKFK-FSAFLKVLFFQ	227
		R	
Fun.	CYP9L4	LTIAPDIQRLYEEIILQA-SESPG-WKSLTYDALQGMRYLDMVVSETL	250
	CYP9K1fun	LAVNPGAQERLRNEIDTV-RTSICGADKLSYETLQSMRYMDMVAETL	61
	CYP9M3	LSINPDIQRLRAEIDETREELEDGK-TPTYEILQKMKYLDMMVVSETL	255
	CYP9J14	LTLNRDIQRLYEEIVAT-DIDLQ-QKPLTYEALQHMKYMDMMVVSETL	252
	CYP9J13	LMLHPEVQDRLYEEIVGV-DEKLN-GKPLNYEAVQGMRYMDMMVVSETL	248
	CYP9J12	LAVNDDIQRLFEVHES-EQSLEEKLSYKELQSLPYLDMVVSETL	261
	CYP9J11	LTVMKDAQNKLYEEIRAT-SKSLG-GSSLTVDALQNMQYMDMMVVSETL	258
Gamb.	CYP9K1gam	-----	-----
	CYP9L1	VTLAPEIQRLYEEIQQV-SETLD-GKALTYDALQGMRYLDMVVSETL	406
Cx.	CYP9C1Cul	-----	-----
	CYP9B2	MSQMPNVKQKLQAEIDQVKEQLSTTD SKLSYEVLOQMKYLDMMVVSETL	403
	CYP9B1Cul	LALNPDVQEKLRKEVEDT-NRMLN-GGSLTYDSLHKMTYLDMMVLESRLMPPASAVDRY	403
Aed.	CP9J1	LTVMQDIQRLYEEIAVT-ESTLNGQP-ITYEALQKMAVLDMMVVSETL	407
	CYP9J2	LTVMQDIQRLYEEIAAT-ESTLNGQP-ITYEALQKMAVLDMMVSEALRKYPTATLTDYR	407
Dros.	CYP9B1Dro	LLRNLDIQERLYEEVKET-QEALKGAP-LTYDAAQEMTYMDMVISLSLRKWTLSAAADR	377
	CYP9C1Dro	LHMNPEVQEKLLAEIILAV-KEQLGKGP-LDYDTLMGMKYLNCVVSESRLKWTLPFAVDRM	392
	CYP9B2Dro	LLYNPDVQERLYEEIVET-KKALNGAP-LTYDAVQKMTYMDMVISLSLRKWTLSAAADR	375
Helio.	CYP9A1V2	LAVNPDVQDRLLQEIREFY-DEKNH--GKIDYVNVVQSMTYLDMVVSEGLRLWPPAAVDRV	399
		ETLR	
Fun.	CYP9L4	-----	-----
	CYP9K1fun	CTKPYVLEDYNG-HKVQLQKGDGLVWP--AAAIMRD PQLFPEPDRFWRPERFAPDSPTPID	118
	CYP9M3	-----	-----
	CYP9J14	-----	-----
	CYP9J13	-----	-----
	CYP9J12	-----	-----
	CYP9J11	-----	-----
Gamb.	CYP9K1gam	-----	-----
	CYP9L1	CNQDY---TIPGDDIVIPKG--ATVFPIAGLHYDPRFYPDPDRFDRPERFNDENKHKIP	461
Cx.	CYP9C1Cul	-----	-----
	CYP9B2	-RACTKPYTIEDNMGTKVTIQVGDLIQIPIQSIHRDHRFYPNPYKFDPERFSEENKAMIN	462
	CYP9B1Cul	CVKDY---VLDDGGGLKFTIEKGAGIWLPIQGIHHDPRFVYMNPKKFDPERFMEKRRLEIQ	460
Aed.	CP9J1	VNKDYVFDDEEGLRFVIEK-GKTIWIP--MLALHHDPKYFPERFDRPERFSEDMRSKIV	464
	CYP9J2	ANKDYVFDDEEGLRFVIEK-GKTIWIS--MLALHHDPKYFPERFDRPERFSEDMRSKIV	464
Dros.	CYP9B1Dro	CAKDYTLTDDGKTLKFEFKAGDNINIP--ICGLHWDERFFFQPPQRFDPERFSEERKDLI	435
	CYP9C1Dro	CGSDFQLKDEEGEVVNLREDDLVHIN--VGLHHD PDMFPEPEQFRPERFDEEHKHEIR	450
	CYP9B2Dro	CSKDYTLTDDGKTLKFDKVGDRINIP--ISGLHLDTRYFPERPKFDPRFSEERKGDV	433
Helio.	CYP9A1V2	CVKDYNIGRPMEQATKDLIHTGQAVAI SPWPHRNPKFFPEPAKFDPERFSPENRHKIQ	459

Fun. CYP9L4	-----	
CYP9K1fun	CTKPYVLEDYNG-HKVQLQKGDGLWVP--AAAIMRDPQLFPEDRFWPERFAPDSPTPID	118
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1gam	-----	
CYP9L1	CNQDY---TIPGDPDIVIPKG--ATVFIPIAGLHYDPRFYDPDRFDPERFNENKHKIP	461
Cx. CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2	-RACTKPYTIEDMNGTKVTIQVGDLIQIPIQSIHRDHRFYFNPYKFDPERFSEENKANIN	462
CYP9B1Cul	CVKDY---VLDDGQGLKFTIEKGAGIWLPIQGIHHDPRFYNNPKKFDPERFNEKRRELIQ	460
Aed. CP9J1	VNKDYVFDDEEGLRFVIEK-GKTIWIP--MLALHHDPKYFPEPERFDPERFSEDNRSKIV	464
CYP9J2	ANKDYVFDDEEGLRFVIEK-GKTIWIS--MLALHHDPKYFPEPERFDPERFSEDNRSKIV	464
Dros. CYP9B1Dro	CAKDYTLTDDEGTLKLFKAGDNINIP--ICGLHWDERFFPQPQRFDPERFSERRKDLI	435
CYP9C1Dro	CGSDYFQKDEEGEVVNLREDDLVHIN--VGALHHDPDFPEPEQFRPERFDEEHKHEIR	450
CYP9B2Dro	CSKDYTLTDDEGTLKLFKAGDRINIP--ISGLHLDDRYFPEPRKFDPRFSEERKGMV	433
Helio. CYP9A1V2	CVKDYNIGRPNEQATKDLIHTGQAVAI SPWL FHRNPKFFPEPAKFDPERFS PENRHKIQ	459
Fun. CYP9L4	-----	
CYP9K1fun	TASILTFXAGP-----	129
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1gam	-----	
CYP9L1	LGAYLFFGIGPRNCIASRFALMEVKAI VYHILLNLYELKRSERTSVPVKLAKGFSPLKPEN	521
Cx. CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2	RS AFLPFGSGPRNCIGSRLALMQTKCFLYYTLANFELELCPKTDVPIKLMKRSVSLD TLS	522
CYP9B1Cul	PGTYMPFGIGSRNCIGSRFALMEVKC IMYYLLNFTIERCNMTTVPPTIVKGFSL LATEK	520
Aed. CP9J1	PGTYLFFGAGPRSCIGPRLALLEVKMALYHLVKDFNLQASEKTQIPLRLSKSAFTMQAEN	524
CYP9J2	PGTYLFFGAGPRSCIGPRLALLEVKMALYHLVKDFNLQASEKTQIPLRLSKSAFTMQAEN	524
Dros. CYP9B1Dro	PYTYLFFGVGPRSCIGNRYAVMQAKGMLYNLMLNLYKIEASPRTTDRDMWESARGFNLIPTT	495
CYP9C1Dro	QFTYLPFGVQQRSCIGNRLALMEVKS LIFQLVLRVYHLKPTDRTPADMMSSISGFRLLPRE	510
CYP9B2Dro	PYTYLFFGVGPRNCIGNRYALMQVKMLFNLLLHYKIEASPTIKDLWGSASGFNFPTPRS	493
Helio. CYP9A1V2	PFTYFPFGLGPRNCIGSRFALCEIKVILYLLIREMEVYVFEKTIYPPQLSKDRFNMHLEG	519

Fun. CYP9L4	-----	
CYP9K1fun	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1gam	-----	
CYP9L1	GMYLKFNPRMKN--	533
Cx. CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2	GFWMFRMVPRGEMKK	536
CYP9B1Cul	PIIVKLLPK----	529
Aed. CP9J1	GVWLELKARPKA--	536
CYP9J2	GVWLELKARPKA--	536
Dros. CYP9B1Dro	GFWMQLVSRK----	505
CYP9C1Dro	LFWCKLESRGPA--	522
CYP9B2Dro	GFWMHLVPRK----	503
Helio. CYP9A1V2	GAWVRLRVRPEKS-	532

Figura 29. Alineamiento completo de secuencias de proteínas de la familia CYP9 de diferentes insectos

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: región a partir de la cual se diseñó el iniciador Forward. R: región a partir de la cual se diseñó el iniciador reverse. Fun: *A. funestus*. Gamb: *A. gambiae*. Cx: *Cx. quinquefasciatus*. Aed: *Ae. aegypti*.



Fun. CYP9L4 PKLMAWLEIDIFDRKHVQFFTELFRHSVQEREQHGIVRLDMIHLLMQANKGLH-HQPQD 148
 CYP9M3 PKVFRFLRLSGMYKDVMEFYLDVSRNIKRETMRI TRPD FIHLLLQARKNTLGAEKHDD 152
 CYP9J14 PWIMEKLEVDLFDRELNSFFAEIVLETEKTRELQGIWRPDMIHLLMQARKGILKRHEQE 150
 CYP9J13 PRVMLKLNLELMDKEMCQHFFHAMIMDMNKVREEKGIWRNDMINLLMQVKRGMLSHQRDE- 147
 CYP9J12 PKLMXRLNIDFLTPEENRFFXDITILETMRTRADKGIWRPDMIELLMQARKGSLKHQAEE 156
 CYP9J11 PKLMNWXLDLFDREQGDYFTEIIRDTLKREAHGIVRPDMVNLMLQARKGTIKREQRET 156
 Gamb. CYP9K1 -RVMRALRLRLFSAKMTSFFRHVVMDDITQREQGIWRHDMINLLMQARKQLRFDENEN 179
 CYP9L1 PKLMAQLQMDIFDSTHVQFFTEMFRQSVQEREHGIWRPDLIHLLIQARKQLR-YQPQE 292
 Cx. CYP9C1 PQVFIFLGLRLTRPDVADFYEDITLSTC----- 258
 CYP9B2 KSFFRTRLRIRIFPKEATDFYVDVSKTIKQREHNIWRPDIHLLVQGRKNEKMEQADD 292
 CYP9B1 PDWMARFGIDMIGQEQSDFFSKLIKDAIKSRESG-VVRPDMIHLLLQARQGMKHKHQQEV 292
 Aed. CP9J1 PFLQKVFNFDFVDANVAGYFKKLLIDNMDQRKQGIWRNDLVNMLMETKNGALKYEEQDT 296
 CYP9J2 PFLQKVFNFDFVDANVAGYFKKLLIDNMDQRKQGIWRNDLVNMLMETKNGALKYEEFDL 296

. . .

Fun. CYP9L4 RDEV--ESFATAKESNDEK-NLPGNVVTLSEAEMVAQCLIFFLAGFDIVATSMFLMYEL 205
 CYP9M3 ETLQD---AGFSTAQTHAVEQKGEKLSWEDID IAGATASFFFGGIEITTTLLCFASYEL 209
 CYP9J14 ESLA--EGFATAQESDVGA-VD SQHYQTMTQMLVAQCLIFFLAGFDIVANCLTFLAYEL 207
 CYP9J13 -PDV--KDAGFATVHESAV-GKKAITREWSEKELVAQCFLFFLAGFXTISTALGFLAYEL 203
 CYP9J12 PKQEXGTGDFATVEESHV-GRRADRVSXDELIAQAFIFFFAGFETISWTLGFLAYEL 215
 CYP9J11 EDRE--EVKGFATVEESDV-GQTGKGLQMTLEEMVAQCLIFFLAGFDIVSTCLTFLAYEL 213
 Gamb. CYP9K1 IETNG-----GGSQKRSV----- 192
 CYP9L1 SEET--DGFATAKESNEQK-ILPEDMVKLESENEMIAQCLLFFLAGFDIATSMFVLYEV 349
 Cx. CYP9C1 ----- 346
 CYP9B2 QLKSA-----GFSTVEEHLQSSSTENSQYSDLDITAAAAFFFGGLETTTTVICFALYEM 346
 CYP9B1 EQN-----AGFAAVEESEI-GRTHSTHVMTENEMIGQCFFFFLAGFDIVSTALTFLAYEL 346
 Aed. CP9J1 QVPEG-----FATVEESHV-GKSTHSRIWTDNELISQCFFFFAAFDNVSSILTFLSYEL 350
 CYP9J2 QVSEG-----YATVEESHV-GKSTHSRIWTDNELISQCFFFFAAFDNVSSILAFLSYEL 350

Fun. CYP9L4 TIAPDIQRLYEEILQASESPG--WKS LTYDALQGMRYLDMVVS\$ETL----- 250
 CYP9M3 SINPSIQDRLRAEIDETREELED-GKTPTYEILQKMKYLDMVVS\$ETL----- 255
 CYP9J14 TLNRDIQDRLYEEIVATDIDLQ--QKPLTYEALQHMKYMDMVVS\$ETL----- 252
 CYP9J13 MLHPEVQDRLYEEIVGVDEKLN--GKPLNYEAVQGMRYMDMVVS\$ETL----- 248
 CYP9J12 AVNDDIQXRLFEEVHESEQSLEE-GKSLSYEKQLQSLPYLDMVVS\$ETL----- 261
 CYP9J11 TVNKDAQNKLYEEIRATSKSLG--GSSLTYDALQNMQYMDMVVS\$ETL----- 258
 Gamb. CYP9K1 -----
 CYP9L1 TLAPEIQRLYEEIQVSETLD--GKALTYDALQGMRYLDMVVS\$ETL\$KWS\$PSPGTRMC 407
 Cx. CYP9C1 -----
 CYP9B2 SQMPNVKQKLQAEIDQVKEQLSTTD SKLSYEV LQNMKYLDMVVS\$ETL\$RMAPLGLTNRAC 406
 CYP9B1 ALNPDVQEKLRKEVEDTNRMLN--GSSLTYDSLHKMTYLDMVL\$ESLHMWPPASAVDRYC 404
 Aed. CP9J1 TVNQDIQRLYEEIAVTESTLN--GQPITYEALQK MAYLDMVVS\$ETL\$KYPATLTDTRYV 408
 CYP9J2 TVNQDIQRLYEEIAATESTLN--GQPITYEALQK MAYLDMVVS\$EAL\$KYPATLTDTRYA 408

R

ETLR

Fun. CYP9L4 -----
 CYP9M3 -----
 CYP9J14 -----
 CYP9J13 -----
 CYP9J12 -----
 CYP9J11 -----
 Gamb. CYP9K1 -----
 CYP9L1 NQDYTI PGDPDIVIPKG--ATVFIPIAGLHYDPRFYPDPDRFDPERFNDENKHKIPLGAY 465
 Cx. CYP9C1 -----
 CYP9B2 TKPYTIEDNNGTKVTIQVGDLIQIPIQSIHRDHRFYPNPKYKDFPERFSEENKANINRSF 466
 CYP9B1 VKDYVLDGQGLKFTIEKGAGIWLPIQGIHHDPRFYNNPKKDFPERFNEKRRLIPIQGTY 464
 Aed. CP9J1 NKDYVFDDEEGLRFVIEKGTIWI PMLALHHD PKYFPEPERFDPERFSEDNRSKIIVPGTY 468
 CYP9J2 NKDYVFDDEEGLRFVIEKGTIWI SMLALHHD PKYFPEPERFDPERFSEDNRSKIIVPGTY 468

Fun. CYP9L4	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	-----	
CYP9L1	LPGGIGPRNCIASRFALMEVKAIVYHILLNVELKRSERTSVPVKLAGFSPLKPENGYL	525
Cx. CYP9C1	-----	
CYP9B2	LPFGSGPRNCIGSRLALMQTKCFLYYTLANFELELCPKTDVPIKLNKRSVSLDTLSGFWF	526
CYP9B1	MPFGIGSRNCIGSRFALMEVKCIMYYLLLNFIERCNMTTVPPTIVKGFSLATEKPIIV	524
Aed. CP9J1	LPFGAGPRSCIGPRLALLEVKMALYHLVKDFNLQASEKTQIPLRLSKSAFTMQAENGWVL	528
CYP9J2	LPFGAGPRSCIGPRLALLEVKMALYHLVKDFNLQASEKTQIPLRLSKSAFTMQAENGWVL	528
Fun. CYP9L4	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	-----	
CYP9L1	KFNPRMKN--	533
Cx. CYP9C1	-----	
CYP9B2	RMVPRGEMKK	536
CYP9B1	KLLPK-----	529
Aed. CP9J1	ELKARPKA--	536
CYP9J2	ELKARPKA--	536

Figura 30. Alineamiento completo de secuencias de mARN de la familia CYP6 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador Forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. W:A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. Fun: A. funestus. Gamb: A. gambiae. Min: A. minimus. Dros: D. melanogaster. Mus: M. domestica. Helic: Helicoverpa armígera

```

Fun.CYP6P9 -----
  CYP6M8 -----
  CYP6M7 -----
  CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 -----
  CYP6Z1 -----
  CYP6P2 -----
  CYP6M1 -----
  Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 GCCCCAAGTGGCGTGCCTAGAGCTTTAATTGTCGGTTGTGTACGGGGTGCTCAGAATTT 60
  CYP6A2 -----
  CYP6A8 -----
  Mus.CYP6D1 -----
  Helic CYP6B7 -----

Fun.CYP6P9 -----
  CYP6M8 -----
  CYP6M7 -----
  CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 -----
  CYP6Z1 -----
  CYP6P2 -----
  CYP6M1 -----
  Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 ATAGATCCAATAAAAAGTTTCTTGAAAATTGCTGGACAAACTTGTTGCGAATTAGGCCAGT 120
  CYP6A2 -----
  CYP6A8 -----
  Mus.CYP6D1 -----
  Helic CYP6B7 -----

```

```

Fun.CYP6P9 -----
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 -----
CYP6Z1 -----
CYP6P2 -----
CYP6M1 -----
Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 TGCAAATAAAATTGTGTGACTAAAAAACCTGTATATTTTCAAAGTGGCGATACCCATTA 180
CYP6A2 -----CGAAAAG 7
CYP6A8 -----AGTCGTATTCGAAGAT- 16
Mus.CYP6D1 -----
Helic.CYP6B7 -----TCATAACAAGGTCATCAACGGTTGTG 26

Fun.CYP6P9 -ATGGAGCTAATTAACGGCGGTGTTGGCCGCGTTCATCTTC-GAAGTGTCCGC-----AG 52
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 -ATGGAGCTAATTAACGGCGGTGCTGGCCGCGTTCATCTTC-GCAGTGTCCGAT-----CG 52
CYP6Z1 -----ATGATCCTTTACACGATCGGACTGATCGTGG 31
CYP6P2 -ATGGAGCTCTTGACCTTGACTTTGTCTGTTGCTGGTCGCG-CTCGCGACCCG-----GC 52
CYP6M1 -ATGTGGTTCCCAACCATAGAAAGTTCTCGTAGCGCTTCTG-GCACTACTCGGTGGAGCAG 58
Min.CYP6P7 -ATGGAGCTCGTAACTACAATTTTATCATTACTATTTGTG-CTAGCGTCCGG-----GC 52
Dros.CYP6G1 CATCGACATCCCAAAATGGTGTGTGACCGAGGTCCTCTTT-GTGGTGGTCGCGCGACTGG 239
CYP6A2 GGAGCAGCTACGCAAAATGTTTCTAATATACCTGTTG-ATCGCGATCTCCTCGCTTT 66
CYP6A8 CATCCGCCCTCAGCATGGCGTTGA-CITACATCCTTTTCAAAGTGGCGGTGCGCCCTACTGG 75
Mus.CYP6D1 -----ATGTTATTACTGCTACTGATTGTGGTGA 28
Helic.CYP6B7 TAAACAGCTCCTCAAAATGTGGTCTTATATCTACCGCA-GTGTATCAGTGCATAATCG 85

Fun.CYP6P9 TG-----TACCT-TTTCATTTCGGAACAAACATAAATTACTGGAAAGCAGATGGATTCCCG 105
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 TG-----TATCT-GTTCATACGCAATAAGCATAAATTATTGGAAGGACAATGGATTTCGG 105
CYP6Z1 CGTTTGTTTTCT-CGCCCTCAAAGTACGTCTACTCGTACTGGGATCGACAGGGGCTGCCG 90
CYP6P2 TG-----TATCT-GTTTGTGCGCAACCGGTACAATTACTGGAGCAACCGTCAGTTTCCC 105
CYP6M1 TG-----TACTT-TATCGTACGCAAAACATCC--TACTGGAAGGAGCGTGGCGTACCG 108
Min.CYP6P7 TG-----TATTG-GTTCITGCGCAATCGGTACAACACTACTGGACTAACCGTGGCTTCCCG 105
Dros.CYP6G1 TGGCGCTCTACAC-ITGGTTCCAGCGCAACCATAGCTACTGGCAACGCAAGGGCATAACC 298
CYP6A2 TGGC---CTAC---TTGTACCACCGCAACTTCAACTACTGGAATCGCCGCGCGGTGCCA 119
CYP6A8 CGATC-TTAACGTACTATATCCACCGCAAGCTAACATATTTCAAAGCGTCGAGGGATTCCC 134
Mus.CYP6D1 CGACCTCTACAT-CTTTGCCAAACTTCATTATACGAAATGGGAACGTTTGGG--TTTCG 85
Helic.CYP6B7 TTACCCTTTATTTATATTTTACAAGAACATTTAAC-TATTGGAAGAAACGAAATGTTCTG 144

Fun.CYP6P9 TATGGCCGAACCCACATTTTCTGTTTCGGACACGCGAAAGGACAGGCCAGACAAAGGCAT 165
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 TACGCTCCGAATCCACACTTTTTGTTTCGGCATGCGAAGGGCCAGGCCAGACGGCGCAC 165
CYP6Z1 AAT---TTGAGGCCCGAAATTCCTACGGCAATCTACGCATTCTAGCCCAAAAGAAAGAA 147
CYP6P2 ACCCTGCCCAACCAAAAGCTACTGTTTGGCCACGTAAGGGTGTAAATACCGAGCGGCAC 165
CYP6M1 CAC---CCAAAGCCAACATTTCTTCTCGGCAGCTTCAAAGATGCCGGCAGCAAGATACAC 165
Min.CYP6P7 ACCGTTCCCAATCAAAAGCTGCTGTACGGACACGTTAAGGGCACCACACTGAGCGTAC 165
Dros.CYP6G1 TATATTCCG---CCCACGGCATCATTGGCAACACCAAGGTGGTCTTCAAAGATGGAGAAC 355
CYP6A2 CACGATGCT---CCTCACCCACTGTATGGCAACAT--GGTCGGTTCGGGAAGAACCCGG 174
CYP6A8 TTC---GTTGCACCGCATCTCATAGGGGAAACATGGAGGAATTA---CAAAAGACGAAA 188
Mus.CYP6D1 AATCGGATAAGGCCACCA-TACCCCTGGGCTCGATGGCAAAGGTATTCCACAAGGAACGG 144
Helic.CYP6B7 GGG---CCGGAACCAACTGTATTCTTCGGGAACCTGAAGGATTCAACCCCTTCGCAAGAAA 201

```

Fun. CYP6P9	GCGGCCGACAT---CCATCTGGAAGTGTACAAAAAATTC AAGCAGCGCCGTGAGCGGTAC	222
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	GCGGCCGACAT---CCATCAGGAGCTGTACCGATACTTCAAGCAGCGGGGCGAACCGGTAC	222
CYP6Z1	TCCTTCAATGTGGCTATTAACGATCTGTACGACCGTTCCAGTGAACGG-----TTG	198
CYP6P2	GCTTCGTACAT---CTCGAGTGAATCTATCGCGAGTTAAGAAGCGTGGTGATGCATTT	222
CYP6M1	TTCACCGAGG-----AGGTAGAACGTTACTACGCCATTTTCAAAAGGAAACACCCGTTT	219
Min. CYP6P7	GCCTCGTACAT---CACGGCCGAAATTTACCAGCAGCTGAAAAAGCGTGGTGACTCATTC	222
Dros. CYP6G1	TCCTTTGGGATGCACCTATCGGAGATATAACAATGATCCGCGGCTGAAGGACGAGGCTGTG	415
CYP6A2	TGATGCACGAC-TTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTTCCCTTC	233
CYP6A8	AATATCCACGAGATATTC AAGATCACTATAACAAATTCAGGGAAGCAAGGCACCGTTT	248
Mus. CYP6D1	CCATTTGGCCTGGTTTTGTCCGACATATATGACAAATGCCACGAGAAG-----TG	195
Helic. CYP6B7	AATATAGGAATAGTGATGGAAGAAATTTACAACCAGTTTCCGGATGAAAAAGTG-----	255
Fun. CYP6P9	GTTGGTGTGAGCCAGTTCATGATACCTTCATTGCTCGTGATCGATCCAGAGCTGGTGAAG	282
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	GCGGCCATTAGCCAGTTTATCGTGCCCTCGGTGCTGGTGATCGACCCGGAGCTGGCGAAG	282
CYP6Z1	GTTGGAGTGTATCTGTCTTCCGCCACCGATCCTGGTCCGGGATGCGCATCTCGCCAAAG	258
CYP6P2	GCGGCCTTCAACATGTTTCGTATACCGGCGGTAATGGCGATCGATCCGGAGTTTCAACAA	282
CYP6M1	ATGGCGGTGTACATGTGACGACACCGGTCTGACTGCCGCTGGATCTGGAGCTGATCAAG	279
Min. CYP6P7	GGTGGCTTGAACGTGTTTATCATAACCGCGGTCTGTTGGTGCATCCGGAGCTAATCAAA	282
Dros. CYP6G1	GTGGGCATCTACTCCATGAACAAGCCCGGCTTGATAATACCGGACATAGAGCTGATCAAA	475
CYP6A2	GTGGGCTTTTACTTTTCTGCACAAGCCGGCCGCTTCATCGTGACACCCAGCTGGCCAAAG	293
CYP6A8	GTTGGATTCTTCTTTTCCAGAGTCCCGCTGCATTTGTGATAGATCTTGAAGTGGCCAAAG	308
Mus. CYP6D1	GTGGGCATTTATTTGTTCTTCAAGCCGGCCCTACTGGTGGCGGATGCCGAATTTGGCGAGA	255
Helic. CYP6B7	GTTGGAATGTATAGAATGACCACACCCTGCTACTGGTACGTGATTTGGATGTGATTAAG	315
Fun. CYP6P9	ACGATCCTAGTAAAGGACTTTAATGTATTCCACGATCATGGTGTATTCAATAATGCAAGA	342
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	ACGATCCTGGTGAAGGATTTTAAACGTGTTTACCGATCACGGCGTGTTTACCAATGCAAAAG	342
CYP6Z1	CGGATAATGGTGAACGATTTCCAGCACTTTACGACCGTGGCGTCTACTGCAACGAGCAC	318
CYP6P2	ACGATACTCGTCAAAGATTTCCACATCTTTACGACCGGGGTCTGTTTACGCGATCCCGAG	342
CYP6M1	GCGATCTTCGTGAAGGATTTCCAGTACTTTACCGATCGGGCACGTACTACAACGAAAAG	339
Min. CYP6P7	ACGATACTGGTGAAGGATTTCCACATCTTTACGATCGAGGACTGTTTACGTGATCCCGAA	342
Dros. CYP6G1	TCCATTTCTGATCAAGGACTTCAATCGGTTCCACAACCAGATACGCCCGCTGCGATCCCCAT	535
CYP6A2	AACATCTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCAACAGGGGCGC	353
CYP6A8	CAAACTACTGATTAAGGACTTCTCGAATTTCTCGAACAAGGATATATTTTCAACAATGAAAA	368
Mus. CYP6D1	CAAAATTTGACCACAGATTTTAAATAGCTTCCATGATCGTGGCCTCTATGTGGATGAGAAA	315
Helic. CYP6B7	CATATCATGATTAAGACTTTGAAAGCGTTCCGATGATCGTGGCGTGAATTCAGTAAGGAA	375
Fun. CYP6P9	GACGACCCGCTGT---CCGCACATCTTTTTGCGCTTGAAGGTAACCCATGGCGCTTGTGTG	399
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	GACGACCCGCTCA---CGGGACATCTGTTTCGCACTGGAGGGCCAACCGTGGCGGTTGATG	399
CYP6Z1	AGTGATCCGATGT---CGGCCAACCTGTTTCGCCCTGCCCGGCCAGCGGTGGAAGAAATCTG	375
CYP6P2	ATAGATCCACTGT---CGGCACCGTGTTCGCGCTGCAGGGCAAGCGGTGGAAGATCCTG	399
CYP6M1	CACGACCCACTGA---CCGCCATCTGTTCAATTTGGAGGGTCAAAAATGGCGCAATCTT	396
Min. CYP6P7	GTTGATCCCTGT---CGGCACGCTGTTTCGCGTTGCAGGGCAAACCGTGAAGATTTTG	399
Dros. CYP6G1	GGCGATCCATTGGGCTATAATAAACCCTGTTCTTCGTCAGGGATGCCCATTTGGAAGGGAAT	595
CYP6A2	GACGACCCGCTCA---CGCAGCA-CCTGTTCAACCTGGACGGAAAGGATGGAAGGACATG	410
CYP6A8	GATGATCCCATTTC---TGCCCATCTC-TTCAATCTGGACGGTGGCCAGTGGCGTTTGTTA	425
Mus. CYP6D1	AATGATCCAAATGT---CGGCGAATTTATTCGTAATGGAGGGTCAATCATGGCTAGCCTG	372
Helic. CYP6B7	GG-----ATTGG---GACAAAACCTTGTTCACGCTGACGGAGAAAACGTGGAGGCATTA	426

Fun. CYP6P9	CGTCAGAAGCTCACGCCAACGTTACCTCAGGTCGCATGAAGCAAATGTTTGGTACACTA	459
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	CGCCAGAAGCTTACGCCGACGTTACCTCGGGCCGAATGAAGCAAATGTTCCGGCACAATA	459
CYP6Z1	CGTGCCGAAGCTTACACCAACCTTCACCTCCGGCCAGCTACGGCACATGCTGCCAACGTTT	435
CYP6P2	CGCCAAAAGCTCACGCCACCTTCACGTCGGGCAAGATGAAGCAAATGTTTCCACCGGTG	459
CYP6M1	CGCAACAAGATGACACCCACGTTACGTCGGGAAAGATGAAGATGATGTTCCCGACGGTG	456
Min. CYP6P7	CGCCAAAAGCTAACGCCACATTTACCTCGGGCAAGATGAAGCAAATGTTTACCACGATA	459
Dros. CYP6G1	CGCACCAGCTGACTCCCGTTTTCCACGCGGCAAGGTCAAGCAGATGTACACCCTTATG	655
CYP6A2	CGCCAGAGGCTGACGCCGACTTTACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTG	470
CYP6A8	AGGAACAAATTATCCTGACCTTTACATCCGGTAAATGAAGTAAATGATCCTCCGACCGTA	485
Mus. CYP6D1	AGAATGAAATTGGCCCCCTCGTTTTCTCGGGTAAACTCAAGGGGATGTTCCGAAACGGTC	432
Helic. CYP6B7	AGAAACAGATTTACACCTATTTTACATCTGGTAAATGAAAAACATGTTTATCTTATG	486
Fun. CYP6P9	TGGGATGTAGCACTTGAGCTGGACAAGTATATGGAAGAAAAC---TATCGTCACGCCGAT	516
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	CGGGATGTGGGGCTTGAGCTGGAAGAAAGTGTATGGAGCAAAGC---TACAACCAACCGGAG	516
CYP6Z1	CTGGCAGTGGGCAGCAAGCTCGAGCAGTATCTCGAACGCTTGGCAACGAAAAACAGATC	495
CYP6P2	CTGGAGGTGGCCGAACGGTTGGGCCAGCACAGTGGCCACGCAC-----ACCGGACAGA-	511
CYP6M1	GTGGCGGGGGCCAGCAGCTGCGAGACTTTCATGGAGGAAAACGTCAGAAAGCACGGTGAG	516
Min. CYP6P7	CGGGATGTGGCGGAACAGCTCGGTACCTATGTGGACGAGCAC---CTGCACCAGGAAGAG	516
Dros. CYP6G1	CAGGAGATTGGAAGGATCTGGAGCTGCGACTGCGAGGCGTGGAGAGAGAAACTCTGGG	715
CYP6A2	ATCAAGGTGTCTGAGGAGTTCGTCAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCCAAGAAC	530
CYP6A8	GTGTCACTGGCCAAATGAATTTAT-GACCCTGATGCACGAGAAAAGTCCGAAAAAATTCGGT	544
Mus. CYP6D1	GATGATGTGGCGCTAAATTTAATCACTTGAATGAGCGTTTGAAGGATGGCCAGTCCG	492
Helic. CYP6B7	CATGAAGGTGCTGATAACTTTATTGACCACCTGAGCAAAGAGTGTGAAAAAACAAGAG	546
Fun. CYP6P9	A-----TTGAGATGAAGGATGTGCTAGGTCGGTTTTACGACAGATGTGATTGGCACC	567
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	G-----TGGAGATGAAGGATATCCTGGGCCGTTTTACGACGGACGTTGATTGGGACG	567
CYP6Z1	G-----TCGACATGCGTGACATCGTTTTCCGGCTACGTTGCTCGATGTGGTGGCTTCA	546
CYP6P2	-----TGGAGATGAAGGACGTGCTGGCCCGCTACACGACCGATGTGATCGGGACG	561
CYP6M1	A-----TGGAGCTGAAAGATGTGATGGCCCGCTTACGACCGATGTGATTGGGACG	567
Min. CYP6P7	T-----TGGAGATGAAGGAAATTTCTGGTCCGATATACGACGGATGTGATCGGTACG	567
Dros. CYP6G1	AGTTTCATTACGGAGATTAAGGAGATCTGCGCTCAGTTCTCCACGGACAGCATAGCCACG	775
CYP6A2	GGCGCTGTGCTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCAGATGTGATTGGCACC	590
CYP6A8	T-----CTGGAGATACGTGATCTGGTGGCCAGGTTTACGGTGGATGTGATCGGAACC	596
Mus. CYP6D1	CAT---GTTTTGGAATCAAGAGCATTITGACCACCTATGCTGTGACATCATTGGTTCCG	549
Helic. CYP6B7	T-----TTGAAG-TTCACTCCCTTCTCCAGACGTACACCAGTCTACGATCTCATCA	597
Fun. CYP6P9	TGTGCATTGGGATTGAGTGTAAATACGCTTAAGACACCGGACTCGGAATTCGCA-AATA	626
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	TGCGCGTTCCGGATCGAGTGAATACACTTAAGACGACAGACTCGGAGTTCCGCA-AGTA	626
CYP6Z1	GTGTTTTTCGGCTTCGAAGCCAACCTGTCTGCACGATCCCGACGATCGGTTCCGTGTGGCG	606
CYP6P2	TGCGCGTTCCGGATCGAGTGAATACGCTGCGCAACCCGGACTCGGACTTTCTCA-AGTA	620
CYP6M1	TGCGCGTTCCGGAATCGAGTGAACAGTATGCGTGATCCGGATGCGGAGTTCCGGG-CGAT	626
Min. CYP6P7	TGTGCGTTTGGGATCGAGTGAACACGCTGAAAGATCCGGACTCGGAAATTCCTCA-AGTA	626
Dros. CYP6G1	ATTGCATTTGGCATTCTGTGTAACAGCCTAGAGAATCCCAACGAGAGTTCGGTA-ACTA	834
CYP6A2	TGTGCTTTCGGCATTGAGTGAACACGCTGCGCACCCCTGTGCAAGTATTTCCGCA-CCAT	649
CYP6A8	TGCGCCTTTGGCATCCAGTGAACAGTCTGCGCGATGAAAAGGCGGAGTTTCTGT-ATT-	654
Mus. CYP6D1	GTGATATTCGGCTGGAATTCGATAGTTTACCCATCCGGACAATGAATTTCTGTG-TCTT	608
Helic. CYP6B7	TGTGCTTTCGGAGTGAATTATAACAGCATCAGCGAT--AAAGTTCAGACTCTAGA-AAT-	653

Fun. CYP6P9	CGGCAACAAAGCGTTTGGAGTTTAATCTGATGATTATTCTAAAAACTTTCTTA-----	678
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	CGGCAACAAAGCGTTTGGAGTTGAATACGATGATCATGATGAAGACTTTCTC-----	678
CYP6Z1	TTGCGTGATCTTAACAATCCGGACAGCTTCATGAACAACATCCGAACAGCCGGC-----	660
CYP6P2	CGGCAACAAAGTGTTCGAGCAGAAGGTGTCCACCATGATCAAGATCATTTTTG-----	672
CYP6M1	GGGGAAACTGTTTGTGGAACGGCAACCCTGCCAGTTTGTAAACATGA---TG-----	675
Min. CYP6P7	CGGCAACAAAGTGTTCGATCAGAAGGTGTCCACCATGATTAATAATCATTTTT-----	678
Dros. CYP6G1	TGGACGCAAGATGTTACCTTCACCGTAGCCGCGTCCCAAGGACTTCTTTGTG-----	886
CYP6A2	GGGACAGAAGGTGTTCACCGATAT-GCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTC-----	701
CYP6A8	TTGGAAAGAGGTCTTTGGTTGACAAGAGACATGGGACTCTATTGAATGGCTTT-----	707
Mus. CYP6D1	GAGTGATCGTCTATTTAACCCAAAGAGTCGACAATGTTGCAGAGATTTCCGAATTTATC	668
Helic. CYP6B7	TGTAGACAAGATCATT-----TCAGAACCAAGTTACGCTATAGAATTGGATT-----	700
Fun. CYP6P9	-GCATCGGCTTATCCGTCACCTTGTGCGGAAACC CGGAATGAAGATAACATTTCGACGATGT	737
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	-GCGTCGTCCTACCCGACGCTGGTGC GCAATCTGCACATGAAGATCACGTACAACGATGT	737
CYP6Z1	-GTTTTCTGTGTCCCGGGCTGCTAAAGTTTACCGGCATCAATTCGCTATCGCCTCCGAT	719
CYP6P2	-GTGCTGATGGGGCGAAAGATTTTCGAGCAAGTTTACGCTCAAAATTACCGACGCCGATGT	731
CYP6M1	-GTTCAATTTCTCACCGAAACTGTCCCGGCTGTTGGGCATACGGTTTATCGATAAGGAAGT	734
Min. CYP6P7	-ATTATGGTGATGCGTAAATTTAAATCCAACTTTGTGTTGAAATCACCGATCGCGATGT	737
Dros. CYP6G1	-GCCTTCTTCCTGCCAAGCTGGTGCCTGATGCGCATCCAGTTCTTCACGGCGGACTT	945
CYP6A2	-GTGTTCACTTTCCCAAGCTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCCCATGATGCCCGAGGACGT	760
CYP6A8	-ATGCGCAGCTATCCCAAATTTGGCCAGGAAATTTGGGTATGGTTCGAACTGCACCCGATAT	766
Mus. CYP6D1	AAACTTTATTTGTCCACCCTTGGCCAAACTCTTGTGCGGCTTGGTGCCAAAGGATCCGAT	728
Helic. CYP6B7	-ATATG----TATCCTAAATTTATGGCAAACTCAATCTTTCAATTATCCCGACTCCTGT	755
Fun. CYP6P9	GGAACAGTTTTTCTAAAAATTTGTTAAGGAAACGGTAGAATA-TCGAGAAAGTAACAACA	796
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	GGAGCGATTCTTCTGGACATCGTGAAGGAAACGGTCGACTA-CCGGGAGGCGAACAAACG	796
CYP6Z1	GAAAAAGTTTACCACAGAAGTGATCAGTTCCCATCTGCACCA-GCGTGAGACGGGCCAGG	778
CYP6P2	GGAAACGTTCTTTCATGAATCTGGTGC GCAACGGTCGAGTA-TCGGGAGCGGAAACAATG	790
CYP6M1	GTCGGCGTTCTTTCTGAAGGTGGTCCCGGATACGATTGACTA-TCGGGTTAAGAATGGCA	793
Min. CYP6P7	GGAAATCGTTTTCTGAACTCTGAGGGAAACGGTCGAATA-CCGAGAGAACAACAATG	796
Dros. CYP6G1	TTCCCACTTTATGCGCAGCACCATTGGTCACTTATGGAGGA-GCGAGAGCGATCGGGCC	1004
CYP6A2	CCACCAGTTCTTTCATGCGCCTGGTCAACGACACGATTGCCCT-CAGGGAGCGGGAAGACT	819
CYP6A8	TCAGGAATTCATAGTAGAATTGTC-ACAGAAACAGTGGCGGTGCGAGAAAAAGAGCACA	825
Mus. CYP6D1	AACATATCGCCTGCGGACATCGTGAACGGACGATAGAATT-TCGCGAAGAAAAGGGCG	787
Helic. CYP6B7	ACAACATTTCTTCAAAAGTCTTGTGGACAACATTATTAGCCA-AAGGAATGGCAAACTCG	814
Fun. CYP6P9	TTAAACGAAACGACTTTCATGAACCTGCTGTTGCAGATTAAGAATAAGGGTAAGCTGGACG	856
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	TGAAGCGGAACGACTTTCATGAACCTGATGCTGCAGATCAAGAACAAGGGCAAGCTGGACG	856
CYP6Z1	TGATGCGCAAGGACTTTATCCAGATGCTAACGGATCTGC-----GCCGCAAG	825
CYP6P2	TGAAGCGCAACGATTTCTGAACTGCTGCTGCAGATCAAAAACACTGGCAAGCTGTGGG	850
CYP6M1	TACAGCGGAATGACTTTATGGATCTGATGATACGGAT-----GCTGCGGG	838
Min. CYP6P7	TGAAGCGGAACGATTTCTGAACTGTTGATGCAGATCAAAAACACAGGGAAACTGTGGG	856
Dros. CYP6G1	TGCTCCGCAATGATCTCATAGATGCTTGGTGAGTCTGC-----GCAAAAGAG	1051
CYP6A2	TCAAGAGGAACGACTTTCATGAACCTGCTGATTGAACTGAA-----GCAGAAGG	867
CYP6A8	TCAAACGCAACGATTTTCATGACATGCTGATTGAACT---TAAAAATCAAAAGGAAATGA	882
Mus. CYP6D1	TTGTACCGAAAGATCTTCTTCAGTTATTTATACAACCTTAGAAATACTGGTAAAAATTTCCG	847
Helic. CYP6B7	CAGGCCGCAACGATTTTATGGATCTCATACTCGAGCTCCGTCAAAATGGGAGAGGTAAC TA	874

```

Fun. CYP6P9      ACAGCGATGAT-----GGGAGTGTGGCAAGGGTGAAGTA-----GGAATGA 898
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb. CYP6P3     ATAGTGATGAC-----GGTAGTTTGGCAAGGGAGAGGTC-----GGCATGA 898
CYP6Z1         GCTGGTAG-----CAGTGGGGAAGAA-----ACGCTCA 853
CYP6P2         AAGGGGAGGAG-----GACCACATTGGCAAAGGGGAGGTC-----GGCATGA 892
CYP6M1         ACACAGAG-----AACCCGGAGGAA-----GCGCTTA 865
Min. CYP6P7     AAGCGGAGGAG-----GAACACGTTGGAAAAGGGTGAGGTC-----GGGATGA 898
Dros. CYP6G1    G---CGGCTGC-----CGAGCCTTCGAAGCCTCACT--AT-----GCCAAGA 1088
CYP6A2         GGCGCGTCACC-----CTGGACAACGGAGAGGTGATCGAG-----GGCATGG 909
CYP6A8         CTCTAGAGAAAT-----GGCGA--TGTGGTCAGAGGATT-----AACCA 918
Mus. CYP6D1     ATGACAACGACAAGCTATGGCATGACGTTGAGTCGACGGCGGAAAAATCTCAAAGCCATGT 907
Helic. CYP6B7   GTAACAAATAT-----CTTGA--TGGAGTAACATCACTT-----GAAATTA 913
    
```

```

Fun. CYP6P9      CACAACGAGAAGCTAGCGGCCACAGGCATTCATTTTCTTCTTGGCCGGTTTCGAGACATCAT 958
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb. CYP6P3     CACAGAACGAGCTAGCGGCCACAGGCCTTTTGTGTTTTTCTTGGCCGGTTTTGAGACGTCGT 958
CYP6Z1         CCGATGCACAGTGTGCGGCCAATGTGTTTCTGTTTTACGGTGTGGGGCCGATACTTCCA 913
CYP6P2         CGATGAACGAGCTGGCGGCGCAGGTGTTTATCTTCTTTTGGCCGGCTTCGAGACGTCCT 952
CYP6M1         CCTTCAACGAGGTGGCGGCCACAAGCGTTTGTGTTCTTCTTTGCTGGGTTTTGAAACGCTT 925
Min. CYP6P7     CACAGAATGAGCTGGCGGCCAAGTGTATCTTCTTCTTGGCCGGTTTTGAAACGTCCT 958
Dros. CYP6G1    ACCAGGACTTCTCTGGTGGCTCAGGCGGGCGTGTTTTTTACGGCCGGTTTCGAGACCTCCT 1148
CYP6A2         ACATCGCGGAAGTGGCGGCCAGGTGTTCTGTTTTATGTGGCCGGATTTGAGACCTCCT 969
CYP6A8         TGGAGGAGGTTTTG---GCACAAGCCTTTGTGTTCTTCATTGCTGGCTTTGAGACATCCT 975
Mus. CYP6D1     CCATCGATATGATTGCCTCCAATTCATTCTTATTCTATATTGCCGGATCGGAAACAACGG 967
Helic. CYP6B7   CTGACGGAAGTTATATGTGCCAAGCTTTTTGTATTTTACGTTGCTGGATATGAAACCAGTG 973
    
```

F

5'-TCWSICTGTACGAGCTKGC-3'

```

Fun. CYP6P9      CCACGACGCAAAGCTTCTGTCTGTACGAGTTGGCRAAGAACCCTGCATCCAGGAGCGCC 1018
CYP6M8          -----CTGTATGAACTGGCCTGAACCCGGAAGTGCAGGAACAGG 40
CYP6M7          -----CTGTATGAACTGGCCTGAACCCAGGATGCCAGGATAAAG 40
CYP6AA4         -----CTGTATGAACTGGCBAACAACCCGGATATTCAGGAACGTG 40
Gamb. CYP6P3     CCACCACACAAAGCTTCTGTCTGTACGAGCTGGCRAAGAACCCTGCATCCAGGAGCGCC 1018
CYP6Z1         CCGGTACGATTACATTCACACTGCACGAGCTGACBCACAATGCTGAGGGGATGGCTAAGC 973
CYP6P2         CGACCACGATGAACTTCTGCCTGTACGAGCTGGCDAAGCACCCGGACATCCAGGAGCGGT 1012
CYP6M1         CCACACTGCTAACGCTGACGCTGTACGAGCTAGCCTGAACCCCGAGGTGCAGGAAAAAG 985
Min. CYP6P7     CTACCACGATGAACTTTGTGTTGTACGAGCTGGCBAAGAATCCGAGCTGCAGGAACGGC 1018
Dros. CYP6G1    CCTCGACCATGTCTTTTGGCCCTGTACGAGATGGCBAAGCATCCAGAGATGCAGAAAACGCC 1208
CYP6A2         CCTCGACAATGAGTTACTGCTGTATGAGTTGGCTCAGAATCAGGACATTCAGGACAGGC 1029
CYP6A8         CCTCCACCATGGGATTTGGCCATACGAACTGGCBAAGAATCCGGACATTCAGGATAAGG 1035
Mus. CYP6D1     CGGCCACAACATCATTACCATCTATGAATTGGCDAATGTATCCGAAAAATTTGAGGAAGG 1027
Helic. CYP6B7   CAACTACAATGTCTCTATTGATATACCAACTCTCACTTAATCAAGACGTCAAAACCAAGT 1033
    
```

* * * * *

```

Fun. CYP6P9      TTAGACAAGAGATCAACCAAGCAATCGAGGAGAATGAC-----GGCCAGGTGA 1066
CYP6M8          GCCGTAATGCGTGCCTGAAAGTGTGAAAAAACATAAC-----GGCGAAATGA 88
CYP6M7          GCCGTCGTTGCGTGAAGAAGTGTGAAACGTCATAAC-----GGCGAACTGA 88
CYP6AA4         TGCCTGCGGAAGTGTGAAAAAAGTGAACCTGCATGAT-----AACAGATTA 88
Gamb. CYP6P3     TGAGAGAGGAAATTAATCGAGCTATTGCGGAGAACGGT-----GGAGAGGTGA 1066
CYP6Z1         TTCAGCGAGAGGTCGATGAGATGATGGAGCGACACCAC-----GGTGAAATCA 1021
CYP6P2         TGAGGGCGGAAATCGAGCGTGGGTTGGAGGAGAACGGT-----GGCGAGCTGA 1060
CYP6M1         GACGCCAGTGTGTGCAGGAAGTGTCTGCCAAGCATAAT-----GGGAGATGA 1033
Min. CYP6P7     TCCGGAAGGAAATTAACCGAGCGCTCGAGGCCAATGGT-----GGGAACTGA 1066
Dros. CYP6G1    TGCGCCAGGAGATCAACGAAGCTTTGGTGGAGGGCGGT-----GGGTCATTGA 1256
CYP6A2         TGCGCAACGAGATCCAACCGGTGCTGGAGGAACAGGAG-----GGCGAGCTAA 1077
CYP6A8         TTCGGGCTGAGGTGGAGGAGGTCTATGAGCAACATGAC-----CAAACTTTA 1083
Mus. CYP6D1     CCCAAAGCGAGGTGGATGAGTGTCTGCAAAGGCACGGTCTCAAGCCGAGGGACGCTCGA 1087
Helic. CYP6B7   TGATAGCTGAAGTAGATGAAGCAATAAAGCTAGCGAT-----GAAAAAGTAA 1081
    
```

* * * * *

Fun. CYP6P9 CGTACGATGTCGCCATAAACATACAGTATCTGGACAATGTGATAAACGAAACACCTTCGCA 1126
 CYP6M8 GCTATGATGCGGGTGGATATGAAATATCTGGATCAGATTCTGAACGAAAGCCTGCGTA 148
 CYP6M7 CCTATGATGCGGGTGGTAAATGCATTATCTGGATCAGATTCCGAAAGAAAGCCTGCGTA 148
 CYP6AA4 CCTATGATGCGGCTGAAAGAAATGACCTATCTGGATCAGGTGATTAACGAAACCCCTGCGTA 148
 Gamb. CYP6P3 CGTACGACGTGTCATGAACATAAAAGTATTTGGACAATGTGATTGACGAAACCCCTCGGA 1126
 CYP6Z1 CGTACGATAACATCACC GGGATGAAAGTATCTGGATTTGTGCGTGAAGGAAACCGCTTCGAA 1081
 CYP6P2 CGTACGATGTAGTATGGGAAACGGAGTACCTCAACTGGGTCGTGGATGAAACCGCTGCGCA 1120
 CYP6M1 CGTACGACGCTATCCACGACATGAAAGTATTTGGATCAAATTTTGAAGAATCCCTACGCA 1093
 Min. CYP6P7 CGTATGACGTTGTGATGGGTATCGAATATCTGAATAAGGTCGTTGATGAAACCGCTTCGCA 1126
 Dros. CYP6G1 GCTACGAGAAAATCCAGTCCCTGGAGTATCTGGCCATGGTGGTGGACGAGGTGCTGCGCA 1316
 CYP6A2 CGTACGAATCCATCAAAGCCATGACCTACTTGAACCAGGTCACTCAGAAAACCCCTGAGGC 1137
 CYP6A8 CCTACGAGTGCACCAAGGATCTGAAGTACCTCAATCAGGTTTTAGATGAAACTCTGCGAC 1143
 Mus. CYP6D1 CCTATGAGGCCATACAGGATATGAAATATTTGGATTTGTGTGTTATGGAAAACCCCGCA 1147
 Helic. CYP6B7 CATACGACACCGTGAAGGAAATGAGATACCTTGAACAAAAGTCTTTGACGAAACCCCTCGTA 1141

** ** * * *

Fun. CYP6P9 AGTACCCACCGGTAGAATCGTTGAGTCTGTGTCGCGTCTGTTGACTATGTCATCCAGGT- 1185
 CYP6M8 AATATCCGCGGTGCCGGTGCATTTTCGTGTGGCGAGCAAAGATTATCAGGTGCCGGGC- 207
 CYP6M7 AATATCCGCGGTGCCGGTGCATTTTCGTACCACAGCAAAGAAATATCAGGTGCCGGGC- 207
 CYP6AA4 TGTATCCGCGGTGCCGAGCTGATTCGTGTGGCGACCCAGCCGTATGCGGTGGCGGGC- 207
 Gamb. CYP6P3 AGTACCCACCGGTGGAATCGTTAACCCGCGTACCCTCTGTGGACTATCTCATCCCGGGC- 1185
 CYP6Z1 TCTATCCGCGCTTGGCTGTCTGAATCGGGAGTGTACGATCGACTACAAAGTGGCCGACA 1141
 CYP6P2 AGTATCCCGCGTGGAAACGGTTACGCGTGGCCCGGAGCATGATTACACCGTCCCGGGC- 1179
 CYP6M1 AGTATCCCTCCAGTCCGATGCATTTCCGTATGACGGCACAGGACTACCGGCTGCCTGAC- 1152
 Min. CYP6P7 AGTACCCGCGACTGGAATCGATCACACGCGCTCCGGAAACAAGATTACACCATCCCGGGT- 1185
 Dros. CYP6G1 TGTATCCGCTGTGCGCTTCCCTGGACCGGAGTACGAGAGCGTGGAGGACAGCCAGACT 1376
 CYP6A2 TCTACACACTGGTCCCCACCTCGAACGGAAAGCCCTCAACGACTACGTTGGTCCCGGGC- 1196
 CYP6A8 TGTACACCATTTGTCCTCAATCTGGATCGAATGGCCGCAAGCGTTACGTAGTTCCTGGTC 1203
 Mus. CYP6D1 AATACCCCTGGCCTGCCGTTTTTGAATCGCAAATGCACTCAGGATTTCCAAGTACCCGAC- 1206
 Helic. CYP6B7 TGTACTCTATAGTAGAACCTCTCGAAAGAAAAGCTACAAGAGACTACCAAATTCCTCGG-- 1199

** * * *

5'-CCGTTTCGGCGAGG-3'
 R

Fun. CYP6P9 GCTTCTCACCGGAGGAAAGTGAAGAAGCGACATCCCTTCACGTTCTCTCCATTTCGGTGAGG 1348
 CYP6M8 GTTTTAGCCCGGAACAGGAAGCGAAACGTCATCCGTATGCGTGGACC CGTTTGGCGAAG 370
 CYP6M7 GTTTTACCCCGGAAGAAAGCGAAACGTCATCCGTATGCGTGGACC CGTTTGGCGAAG 370
 CYP6AA4 GTTTTGGCACCAGTCCGCTGCATAGCCGTCATACCCATGCGTTTCTGCGTTTGGCGAAG 370
 Gamb. CYP6P3 GATTCCTACCGGAGGAAAGTGAAAAAACGACACCCGTTACGTTTATCCATTTCGGCGAGG 1348
 CYP6Z1 GATTCGAT---GAGGCCACAAAGAACTACGACGCGAGATGCGTACTATCGTTCCGGCCCG 1300
 CYP6P2 GGTTCGCGCGGAGGTAGCGAATGACGCGCCCGCGTACGTGTACATGCGTTCCGGCGAGG 1342
 CYP6M1 GGTTCAGTGGGAGGAGGAAAGCGAAACGTCATCCCTTTGCTGGACA CGTTTCGGTGAGG 1315
 Min. CYP6P7 GGTTCAGCCGGAGGTGGCAAAACGCGCTCCACCGTACGTGTACATGCGTTTCGGTGAGG 1348
 Dros. CYP6G1 GTTTCTCACCCGCAACCGCAAGCAATAGTGGCCATGGCATATCAA CCTTCGGATCTG 1556
 CYP6A2 GCTTCTCGCCGAGAAAAGTGGCCGCGCGGAGTCCGTTGGAGTGGCTGCCCTTCGGCGAGC 1362
 CYP6A8 GATTCCTCCCGAAGAAATCGGCTGGTCTCCCTCGGTTGCTGGCTGCCCTTTGGAGATG 1368
 Mus. CYP6D1 GCTTTGCC---GATGAGAGCAAGGATTATGATCCAGCGGCATATATGCTTTTGGAGAGG 1366
 Helic. CYP6B7 GATTCGATGCGGAGGAAAGTGGGCAACGTCACCCGTCGCGTACTTACATTTCGGACTTG 1363

* ** * * ** * *

Fun. CYP6P9 GGGCAGCGTTTGCATTGGGCTTCGGTTTGGTGTGATGCAGACGAAAGTAGGATTGA-TA 1407
 CYP6M8 GCGCG----- 375
 CYP6M7 GCGCG----- 375
 CYP6AA4 GCGCG----- 375
 Gamb. CYP6P3 GACCAAGCATCTGCATTGGGCTGCGGTTTGGCTTGATGCAAAACCAAGTGGGATTGA-TT 1407
 CYP6Z1 GTCCTCGCAACTGTATCGGCTGCGGCAAGGGTTGTTGTTGTCAAAGATTGCGCTAG--- 1357
 CYP6P2 GACCGCATCTGTATCGGCTGCGGTTCCGCGATGATGCAGACGAAAGTGGGCTGA-TC 1401
 CYP6M1 GCGCGCGGTTTGCATCGGTTGCGGTTCCGGATGATGCAGGACGGATCGGGTTGG-CC 1374
 Min. CYP6P7 GCGCTCGGATTTGATTGGGATGCGGTTTGGCATGATGCAGACCAAGTGGGCTGA-TC 1407
 Dros. CYP6G1 GCGCGCAAACTGCATTGGCAGCCGATTGGCCCTGCTACAGAGCAAACTGGGACTGG-TC 1615
 CYP6A2 GCGCGGAACTGCATCGGATGCGGTTTGGCAAAATGCAGGCTCGCATCGGTTTGGCTC 1422
 CYP6A8 GTCCTCGGAAGTGCATTGGCCTGAGATTCGGACAGATGCAGGCTCGCATTGGACTCG-CT 1427
 Mus. CYP6D1 GTCCAAAGGCACTGTATTGCTCAACGATGGGCTTATGAATTCAAAGGTAGCCCTGG-CC 1425
 Helic. CYP6B7 GCAAAGGAATTCATAGGCATGCGGTTTGGCAGACTTCAATCTCTACTATGCATCA-CG 1422

* *

R
 5'-GICC-3'

Fun. CYP6P9	ACGCTGTTGAGAAAGTTCCGCTTCTCACCGTCAGCGCGTACACCAGATTGTGTAAGATTC	1467
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	ACGCTGCTGAGAAAGTTCCGCTTCTCGCCGTCGCGCGGTACGCCGGAACGGGTAGAATAC	1467
CYP6Z1	----TGATGATGCTGTCCCGATTTAACTTTTCGGCCACCATTCCGAGGAAGATAAAGTTT	1413
CYP6P2	ACGCTGCTGCGTCAGTTCGGATTTTCGCGCAGCGGAGCAAAACGCTGACCCTATCCGGTTT	1461
CYP6M1	TATTTGCTGTCAGGGTTTTAGCTTTTCGCGCGTACGAAAAAACTTCCATCCCGATGAAATTC	1434
Min. CYP6P7	ACGTTGCTGCGCCAGTTCGGATTTTCACCGCAGCGGAAAAACCCAGAAACGATCCGATTT	1467
Dros. CYP6G1	AGCCTGCTGAAGAATCACTCAGTGCAGCAACTGCGAGGCCACCATGAAGGACATGAAATTC	1675
CYP6A2	AGATCATCAGCCGGTT-CAGGGTATCCGTCTGCGATACGACAGAGATCCCACTGAAGTAT	1481
CYP6A8	CTGCTCATCAGGAACCTTTAAGTTCTCCACGTGCTCGAAGACGCCCAATCCCTTTGGTCTAC	1487
Mus. CYP6D1	AAAAATATTGGCCAATTTTAATATTCAACCAATGCCCGCCCAAGAAAGTTGAGTTCAAATTC	1485
Helic. CYP6B7	AAGATTTTATCCAAGTTCAGAATAGAGCCATCGAAAAATACCGACAGAACTTACAAGTT	1482
Fun. CYP6P9	GATCCGAAAAATGATCATTCTGTCCACCGATCGCGGGTAATTACTTGAAGGTG-----GAA	1521
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	GATCCGAAAAATGATAACCATAGCGCCGAAAGCGGGCAACTACTTGAAGGTG-----GAA	1521
CYP6Z1	GAGCCCGTTTTCAATCACACTGGCACCGAAAGGAGGCCTTCCAATGAGGATCG---AGAAT	1470
CYP6P2	ATGCCGAACGTGTTTGTGCTGTCCCGGACAGTGGGAACCTATCTGGAGGTG-----GAG	1515
CYP6M1	ATTACGAACAGTTTCATACTGGTCCGAGGGAAAGGCTTATGGTTGAAGGTG-----AAC	1488
Min. CYP6P7	ATGCCGAACGTGTTTCACTATCCCGGACAGGGGAAACTATCTGCATGTG-----GAG	1521
Dros. CYP6G1	GATCCCAAGGGTTTCGTGCTCCAGGCAGATGGTGGCATAATTTGGAGATAGTCAACGAT	1735
CYP6A2	AGTCCCATGTCCATAGTTTGGGCACCGTTGGGGGCATCTACTTGGAGGTG-----GAA	1535
CYP6A8	GATCCCAAAATCATTCTGTAAGGTGTTGGTGTGAAAGACGGAATCTATCTGAAGGTG----GAGAC	1543
Mus. CYP6D1	CATTTCAG---CTCCTGTTCTGGTACCAGTAAATGGTCTCAATGTGGCCCTAT----CGAA	1538
Helic. CYP6B7	GAACCACGCCGTGTTATTATTGGACCAGAAAGGAGGAATACGT-----GTG----AACAT	1532
Fun. CYP6P9	AAGTTG-TAG-----	1530
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	AAGTTG-TAG-----	1530
CYP6Z1	CGTGTTAACATTAA-----	1485
CYP6P2	AAGCTT-TGA-----	1524
CYP6M1	AAGCTG-GAATCGAAGCAAGGTTGA-----	1512
Min. CYP6P7	AAGATA-TAG-----	1530
Dros. CYP6G1	CGCCTC-TACGATCAGAGCGCTCCATCGCTCCAATGAATTTGAATCGCATGAAGTGTGTG	1794
CYP6A2	CGCATC-TAACCTCCATA---TTCGTTGCTCCCATGTAT---ATAGCTTAGGATCCA-A	1586
CYP6A8	CGTCTAATAAACAGACTGAAAACCTCTCAACTAAAAAGCCAAAGCTTCTAACAAAATAACTG	1603
Mus. CYP6D1	GAGGTGTGA-----	1548
Helic. CYP6B7	TGTCCC-TAGGAAGATTGTA---TCTTAA-----	1557
Fun. CYP6P9	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6P3	-----	
CYP6Z1	-----	
CYP6P2	-----	
CYP6M1	-----	
Min. CYP6P7	-----	
Dros. CYP6G1	ATCTGTATGGATACACATATGGATACATATATGTACATATATGGAATAAGTGATTAGTTG	1854
CYP6A2	AGCTAAAGTGATGTACATIT---TAGAC---TGTTCAATTATTAATAAACC---TTAACCT	1638
CYP6A8	ATAAATAGATGGTAATTTATTCAACCTAAATCTTATAGAATCATATTGGGGTAGGTCCTC	1663
Mus. CYP6D1	-----	
Helic. CYP6B7	-----	

```

Fun.CYP6P9 -----
  CYP6M8 -----
  CYP6M7 -----
  CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 -----
  CYP6Z1 -----
  CYP6P2 -----
  CYP6M1 -----
  Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 ATGGGGCAATCGCCTTCTGACAGCTGGCATTTCCTGACTTATGATGCAGATTATATAAT 1914
  CYP6A2 AAACAGCCATATTAACCTTATTGGCCTGTGATAAA----- 1672
  CYP6A8 ATGGCCATTGATCTATCTTTTGTATTATTGCCAGATAATTTAAGTGCTTTTATTTTATTCC 1723
Mus.CYP6D1 -----
Helic.CYP6B7 -----

```

```

Fun.CYP6P9 -----
  CYP6M8 -----
  CYP6M7 -----
  CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 -----
  CYP6Z1 -----
  CYP6P2 -----
  CYP6M1 -----
  Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 GATAATCCGTGTGTTAGAAGCGGCGCCTAGAGTCTACTAAATAAAAACAAATCATTATC 1974
  CYP6A2 -----
  CYP6A8 AGTTTGTA AAAAGGTGTAGGGTAGAATGTTTGAATTCAATAAAAAATCTTATTATAAACAAA 1783
Mus.CYP6D1 -----
Helic.CYP6B7 -----

```

```

Fun.CYP6P9 -----
  CYP6M8 -----
  CYP6M7 -----
  CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 -----
  CYP6Z1 -----
  CYP6P2 -----
  CYP6M1 -----
  Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 AAATTACATTTAATCTGCGTGCTGAGCAGCTAGCAGTACTCAATTGCGCCACCAATAAA 2034
  CYP6A2 -----
  CYP6A8 -----
Mus.CYP6D1 -----
Helic.CYP6B7 -----

```

```

Fun.CYP6P9 -----
  CYP6M8 -----
  CYP6M7 -----
  CYP6AA4 -----
Gamb.CYP6P3 -----
  CYP6Z1 -----
  CYP6P2 -----
  CYP6M1 -----
  Min.CYP6P7 -----
Dros.CYP6G1 TAAATGCAATAAATGCTATCTTTACGATT 2063
  CYP6A2 -----
  CYP6A8 -----
Mus.CYP6D1 -----
Helic.CYP6B7 -----

```

Figura 31. Alineamiento completo de secuencias de mRNA de la familia CYP6 de insectos de la familia Culicidae.

Los nucleótidos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los nucleótidos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador Forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. W:A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. Fun: A. funestus. Gamb: A. gambiae. Min: A. minimus.

Fun.CYP6P9	ATGGAGCTAATTAACGCGG---TGTTGGCCGCGTTTCATCTTCGAAGTGTCCGCAGTGTAT 57
CYP6M8	-----
CYP6M7	-----
CYP6AA4	-----
Gamb.CYP6P3	ATGGAGCTAATTAACGCGG---TGCTGGCCGCGTTTCATCTTCGCAGTGTCCGATCGTGTAT 57
CYP6Z1	-----ATGATCCTTTACACGATCGGACTGATCGTGGCGTTTGTITTC 42
CYP6P2	ATGGAGCTCTTGACCTTGA---CTTTGTCTGTGCTGGTCGCGCTCGCGACCGGGCTGTAT 57
CYP6M1	ATGTGGTTCCCAACCATAGAAGTTCTCGTAGCGCTTCTGGCACTACTCGGTGGAGCAGTG 60
Min.CYP6P7	ATGGAGCTCGTAACCTACAA---TTTTATCATTACTATTGTGTAGCGCTCCGGCTGTAT 57
Fun.CYP6P9	CTTTTCATTTCGGAACAAAACATAAATACTGGAAAGACGATGGATTCCCGTATGCGCCGAAC 117
CYP6M8	-----
CYP6M7	-----
CYP6AA4	-----
Gamb.CYP6P3	CTGTTTCATACGCAATAAGCATAAATACTGGAAAGGACAATGGATTTCGCTACGCTCCGAAT 117
CYP6Z1	CTCGCCCTCAAGTACGCTACTCGTACTGGGATCGACAGGGGCTGCCGAAT---TTGAGG 99
CYP6P2	CTGTTTGTGCGCAACCGGTACAATACTGGAGCAACCGTCAAGTTTCCACCCCTGCCAAC 117
CYP6M1	TACTTTATCGTACGCAAAACAATCCTACTGGAAAGGAGCGTGGCGTACCGCAC---CCAAAG 117
Min.CYP6P7	TGGTTCTTGGCAATCGGTACAATACTGGACTAACCGTGGCTTCCCGACCTTCCCAAT 117
Fun.CYP6P9	CCACATTTTCTGTTCCGACACGGGAAAGG-ACAGGCCAGACAAGGCATGCGGCCGACAT 176
CYP6M8	-----
CYP6M7	-----
CYP6AA4	-----
Gamb.CYP6P3	CCACACTTTTGTGTTCCGGCATGCGAAAGG-CCAGGCCAGACGCGGCACGGCCGCGACAT 176
CYP6Z1	CCCGAAATTCCTACGGCAAT-CTACGCATTCTAGCCCAAAGAAAGAAATCCTTCAATG- 157
CYP6P2	CAAAAGCTACTGTTTGGCCACGTAAGGGTGTAAATACCGA-GCGGCACGCTTCGTACAT 176
CYP6M1	CCAACATTTCTTCCGCGAGTTCAAAGATGCCGGCCAGAA-GATACACTTACCAGAGG- 175
Min.CYP6P7	CAAAAGCTGCTGTACGGACAGTTAAGGGCACCAACTGA-GCGTCACGCTTCGTACAT 176
Fun.CYP6P9	CCATCTGGAACGTGTACAAAAAATCAAGCAGCGCCGTGAGCGGTACGTTGGTGTGAGCCA 236
CYP6M8	-----
CYP6M7	-----
CYP6AA4	-----
Gamb.CYP6P3	CCATCAGGAGCTGTACCGATACTTCAAGCAGCGGGGCGAACGGTACGGCGCATTAGCCA 236
CYP6Z1	----TGGCTATTAACGATCTGTACGACCGTTCCAGTGAACGGTTGGTTGGAGTGTATCT 212
CYP6P2	CTCGAGTGAATCTATCGCGAGTTTAAAGAGCGTGGTGTGATGATTTGGCGGCTTCAACAT 236
CYP6M1	--AGGTAGAACGTTACTACGCCATTACAAGGGAAACACCGTTTCATGGCGCTGTACAT 233
Min.CYP6P7	CACGGCCGAAATTTACCAGCAGCTGAAAAAGCGTGGTGACTCATTCCGTTGGCTTGAACGT 236
Fun.CYP6P9	GTTTCATGATACCTTCATTGCTCGTGTATCGATCCAGAGCTGGTGAACGATCCTAGTAAA 296
CYP6M8	-----
CYP6M7	-----
CYP6AA4	-----
Gamb.CYP6P3	GTTTATCGTCCCTCGGTGCTGGTGTATCGACCCGGAGCTGGCGAAGACGATCCTGGTGAA 296
CYP6Z1	GTTCTTCCGCCACGATCCTGGTCCGGGATGCGCATCTCGCCAAAGCGGATAATGGTGAA 272
CYP6P2	GTTCTGTACACCGCGGTAATGGCGATCGATCCGAGTTCATCAAAACGATACTCTGTCAA 296
CYP6M1	GCTGACGACACCGGTCGTACTGCCGCTGGATCTGGAGCTGATCAAGGCGATCTTCGTGAA 293
Min.CYP6P7	GTTTATCATACCGCGGTCATGGTGGTGTGATCCGGAGCTAATCAAAACGATACGTGTGAA 296
Fun.CYP6P9	GGACTTTAATGTAATCCACGATCATGGTGTATTCAATAATGCAAGAGACGACCCGCTGTC 356
CYP6M8	-----
CYP6M7	-----
CYP6AA4	-----
Gamb.CYP6P3	GGATTTTAACGTGTTTACGATCACGGCGTGTITACCAATGCAAGGACGACCCGCTCAC 356
CYP6Z1	CGATTTCCAGCACITTTACGACCGTGGCGTCTACTGCAACGAGCACAGTGTCCGATGTC 332
CYP6P2	AGATTTCCACATCTTTACGACCGGGGTTGTTACGCGATCCCGAGATAGATCCACTGTC 356
CYP6M1	GGATTTCCAGTACTTTACGATCGCGGCACGTACTACAACGAAAGACGACCCACTGAC 353
Min.CYP6P7	GGATTTCCACATCTTTACGATCGAGGACTGTTCACTGATCCCGAAGTGTCCCTCTGTC 356

```

Fun.CYP6P9      CGCACATCTTTTTGCGCTTGAAGGTAACCCATGGCGCTTGTGCGTCAGAAAGCTCACGCC 416
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb.CYP6P3     GGGACATCTGTTTCGCACTGGAGGGCCAACCGTGGCGGTTGATGGCCAGAAAGCTTACGCC 416
CYP6Z1         GGCCAACTGTTTCGCCCTGCCCGCCAGCGGTGGAAAAATCTGCGTGGCGAAAGCTTACACC 392
CYP6P2         CGGCACCGTGTTCGCGCTGCAGGGCAAGGCGTGGAAAGATCTTGGCCAAAAAGCTCACGCC 416
CYP6M1         CGCCCATCTGTTCAATTTGGAGGGTCAAAAAATGGCGCAATCTTCGCAACAAGATGACACC 413
Min.CYP6P7     CGGCACGCTGTTCGCGTTGCAGGGCAAAACCGTGGAAAGATTTTGGCCAAAAAGCTAACGCC 416

Fun.CYP6P9      AACGTTACCTCAGGTCGCATGAAGCAAATGTTTGGTACACTATGGGATGTAGCACTTGA 476
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb.CYP6P3     GACGTTACCTCGGGCCGAATGAAGCAAATGTTTCGGCACAATACGGGATGTGGGGCTTGA 476
CYP6Z1         AACCTTACCTCGGGCCAGCTACGGCACATGCTGCCAACGTTTCTGGCACTGGGCGAGCAA 452
CYP6P2         CACCTTACGTTCCGGCAAGATGAAGCAAATGTTTCCACGGTGTGGAGGTGGCCGAAACG 476
CYP6M1         CACGTTACGTTCCGGCAAGATGAAGATGATGTTCCCGACGGTGGTGGCGGGCGGCCAGCA 473
Min.CYP6P7     CACATTTACCTCGGGCAAGATGAAGCAAATGTTTACCACGATACGGGATGTGGCGGAACA 476

Fun.CYP6P9      GCTGGACAAGTATATGGAAGAAAAAC---TATCGTCAGCCGGATATGAGATGAAGGATGT 533
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb.CYP6P3     GCTGGAAAAAGTGTATGGAGCAAAGC---TACAACCAACCGGAGGTGGAGATGAAGGATAT 533
CYP6Z1         GCTCGAGCAGTATCTCGAACGCTTGGCAAACGAAAAACAGATCGTCCGACATCGGTGACAT 512
CYP6P2         GTTGGCCAGCACGTTGCCACGCAC-----ACGGACAGA--TGGAGATGAAGGACGT 527
CYP6M1         GCTGGCAGACTTCATGGAGGAAAAACGTTCCAGAAGCACGGTGGAGATGGAAGATGT 533
Min.CYP6P7     GCTCGGTACCTATGTGGACGAGCAC---CTGCACCAGGAAGAGTTGGAGATGAAGGAAAT 533

Fun.CYP6P9      GCTAGGTCGGTTTACGACAGATGTGATTGGCACCTGTGCATTGGGATTGAGTGAATAC 593
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb.CYP6P3     CCTGGCCGTTTTTACGACGGACGTGATTGGGACGTGCCCGTTCCGATCCGAGTGAATAC 593
CYP6Z1         CGTTTCGGGCTACGTGCTCGATGTGGTGGCTTCAAGTGTTTTTCGGCTTCGAAAGCCAACTG 572
CYP6P2         GCTGGCCGCTACAGCACCAGTGTGATCGGGACGTGCCGCTTCGGCATCCGAGTGAATAC 587
CYP6M1         GATGGCCCGCTTACGACCCGATGTGATTGGGACGTGCCGCTTCGGAATCCGAGTGAACAG 593
Min.CYP6P7     TCTGGTCCGATATACGACGGATGTGATCGGTACGTGCTGCTTGGGATCCGAGTGAACAC 593

Fun.CYP6P9      GCTTAAGACACCGGACTCGGAATTCGGCAAATACGGCAACAAAGCGTTTGAGTTTAATC- 652
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb.CYP6P3     ACTTAAGACGACAGACTCGGAGTTCGGCAAGTACGGCAACAAAGCGTTTCGAGTTGAATA- 652
CYP6Z1         TCTGCACGATCCCGACGATGCGTTCCGTTGGCGTTGCGTGATCTTAACAATCCGGACAG 632
CYP6P2         GCTCGCAACCCGGACTCGGACTTTCTCAAGTACGGCAACAAAGTGTTCGAGCAGAAGG- 646
CYP6M1         TATGCGTGATCCGGATGCGGAGTTCGGGCGATGGGAAACTGTTTGTGGAACGGCAAC- 652
Min.CYP6P7     GCTGAAAGATCCGGACTCGGAATTCCTCAAGTACGGCAACAAAGTGTCTCGATCAGAAGG- 652

Fun.CYP6P9      --TGATGATTATTCTAAAAACTTTCTTAGCATCGGCTTATCCGTCACCTTGTGCGGAAACC 710
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4         -----
Gamb.CYP6P3     --CGATGATCATGATGAAGACTTTCCTCGCGTCTCTTACCCGACGCTGGTGGCGAATCT 710
CYP6Z1         CTTTCATGAACAACATCCGAACAGCCGGCTTTTCTGTGTCCCGGGCTGCTAAAGTTTTAC 692
CYP6P2         --TGCCACCATGATCAAGATCAITTTGGTGTGATGGGGCGAAAGATTTTCGAGCAAGTT 704
CYP6M1         --CGTCCGAGTTTGTAAACATGA---TGGTTCAATTTCTACCGAAACTGTCCCGGCTGTT 707
Min.CYP6P7     --TGTCACCATGATTAATAATCAITTTTATTATGGTGATGCGTAAATTTAAATCCAACCT 710

```

```

Fun.CYP6P9      GCGAATGAAGATAACATTCCGACGATGTGGAACAGTTTTTCCTAAAAATTGTTAAGGAAAC 770
  CYP6M8      -----
  CYP6M7      -----
  CYP6AA4      -----
Gamb.CYP6P3     GCACATGAAGATCACGTACAACGATGTGGAGCGATTCTTCTGGACATCGTGAAGGAAAC 770
  CYP6Z1     CGGCATCAATTCGCTATCGCCTCCGATGAAAAAGTTTACCACAGAAGTGCATGATCCCA 752
  CYP6P2     TACGCTCAAAATTACCGACCGGATGTGGAACGTTCTTCATGAATCTGGTGGCGGAAAC 764
  CYP6M1     GGCATACGGTTTATCGATAAGGAAGTGTCCGGCTTCTTCTGAAGGTGGTCCCGGATAC 767
Min.CYP6P7     TGTGTTGAAAATCACCGATGCCGATGTGGAATCGTTTTTCCTGAACCTCGTGAGGAAAC 770

Fun.CYP6P9      GGTAGAATATCGAGAAAAGTAACAACATTAACCGAAACGACTTCATGAACCTGCTGTTGCA 830
  CYP6M8      -----
  CYP6M7      -----
  CYP6AA4      -----
Gamb.CYP6P3     GGTGACTACCGGGAGCGCAACCAAGTGAAGCGGAACGACTTCATGAACCTGATGCTGCA 830
  CYP6Z1     TCTGCACCAGCGTGTGAGACGGGCCAGGTGATGCCCAAGGACTTTATCCAGATGCTAACGGA 812
  CYP6P2     GGTGAGTATCGGGAGCGCAACCAATGTGAAGCGCAACGATTTCTGAACCTGCTGCTGCA 824
  CYP6M1     GATTGACTATCGGGTTAAGAATGGCATAACAGCGGAATGACTTTATGGATCTGATGATACG 827
Min.CYP6P7     GGTGGAATACCGAGAGCAACAACCAATGTGAAGCGGAACGATTTCTGAACCTGTTGATGCA 830

Fun.CYP6P9      GATTAAGAATAAGGGTAAGCTGGACGACAGCGATGATGGGAGTGTGGCAAGGGTGAAGT 890
  CYP6M8      -----
  CYP6M7      -----
  CYP6AA4      -----
Gamb.CYP6P3     GATCAAGAACAAGGGCAAGCTGGACGATGATGACGGTAGTTTGGCAAGGGGAGGAGT 890
  CYP6Z1     TCT-----GCGCCGCAAGGCTGGTAG-----CAGTGGGGAAGA 845
  CYP6P2     GATCAAAAACACTGGCAAGCTGTGGGAAGGGGAGGAGCACATTGGCAAAAGGGGAGT 884
  CYP6M1     GAT-----GCTCGGGGACACAGAG-----AACCCGGAGGA 857
Min.CYP6P7     GATCAAAAACACAGGGAAACTGTGGGAAGCGGAGGAGGAACACGTTGAAAAGGGTGAAGT 890

Fun.CYP6P9      AGGAATGACACAACGAGAAGTACGGGCACAGGCATTCATTTCTTCTTGGCCGGTTTTCGA 950
  CYP6M8      -----
  CYP6M7      -----
  CYP6AA4      -----
Gamb.CYP6P3     CGGCATGACACAGAACGAGCTAGCGGCCACAGGCGTTTGTGTTTTTCTTGGCCGGTTTTGA 950
  CYP6Z1     AACGCTCACCGATGCACAGTGTGCGGCCAATGTGTTTTCTGTTTTACGGTGTGTTGGGCCGA 905
  CYP6P2     CGGCATGACGATGAACGAGCTGGCGGCCAGGTTTATCTTCTTTTTGGCCGGCTTCCA 944
  CYP6M1     AGCGCTTACCTTCAACGAGGTGGCGGCCACAAGCGTTTGTGTTCTTCTTTTGTGGTTTTGA 917
Min.CYP6P7     CGGGATGACACAGAATGAGCTGGCGGCCAAGTGTTTATCTTCTTTCTGGCCGGTTTTGA 950

F 5'-TCWSICTGTACGAGCTKGC-3'

Fun.CYP6P9      GACATCATCCACGACGCAAGGCTTCTGTCTGTACGAGTTGGCAAGAACCCTGACATCCA 1010
  CYP6M8      -----CTGTATGAACTGGCCTGAAACCCGGAAGTGA 32
  CYP6M7      -----CTGTATGAACTGGCCTGAAACCCGGAATGCGCA 32
  CYP6AA4      -----CTGTATGAACTGGCCTGAAACCCGGAATTTCA 32
Gamb.CYP6P3     GACGTCTCCACCCACAAAAGCTTCTGTCTGTACGAGCTGGCAAGAACCCTGGACATCCA 1010
  CYP6Z1     TACTTCCACCGGTACGATTACATTCACACTGCACGAGCTGACCAACAATGCTGAGGCGAT 965
  CYP6P2     GACGTCTCGACCCAGATGAACCTTCTGCTGTACGAGCTGGCAAGCACCCGGAATCCA 1004
  CYP6M1     AACGTCTTCCACTGCTAACGTTGACGCTGTACGAGCTAGCCTGAAACCCGAGGTGCA 977
Min.CYP6P7     AACGTCTTCCACTGCTAACGTTGATGTTGTACGAGCTGGCAAGAATTCGAGCTGCA 1010
                                     ** * ** * * * * **

Fun.CYP6P9      GGAGCGCCTTAGACAAGAGATCAACCAAGCAATCGAGGAGAATGACGGCCAGGTGACGTA 1070
  CYP6M8      GGAACAGGGCCGTAATGCGTGCCTGAAAGTGTGAAAAACATAACGGCGAAATGACGTA 92
  CYP6M7      GGATAAAGGCCGCTGCTTGGCTGAAAGAAAGTGTGGAACCTCATAACGGCGAACTGACCTA 92
  CYP6AA4      GGAACGTGTGCGTGCAGGAAAGTGTGAAAAACTGAACTGCATGATAACAGATTACCTA 92
Gamb.CYP6P3     GGAGCGGCTGAGAGAGGAAATTAATCGAGCTATTGCGGAGAACGGTGGAGAGGTGACGTA 1070
  CYP6Z1     GGCTAAGCTTACGCGAGAGGTGATGAGATGATGGAGCGACACCAGGTGAAATCACGTA 1025
  CYP6P2     GGAGCGGTTGAGGCGGAAATCGAGCGTGCAGGTGGAGGAGAACGGTGGCGAGCTGACGTA 1064
  CYP6M1     GGAAGGGGACGCCAGTGTGTGCAGGAAGTGTCTGCCAAGCATAATGGGGAGATGACGTA 1037
Min.CYP6P7     GGAACGGCTCCGGAAGGAAATTAACCGAGCGCTCGAGGCCAATGGTGGGAACTGACGTA 1070
** * * * * * * * *

```

```

Fun. CYP6P9      TCCTGAGCACTGTCCCGATCCAGAACGTTTCGACCCGGATCGCTTCTCACCCGGAGGAAGT 1307
CYP6M8          TCCGGCCGGTGTTCCTGGATCCGGAACGTTATGATCCGGAACGTTTTAGCCCGGAACAGGA 329
CYP6M7          TCCGGAACATTTTCCGAACCCGGATCTGTTTATCCGGATCGTTTTACCCCGGAAGAAGA 329
CYP6AA4        TCCGACCATTTATCCGGATCCGAAACGTTTATCCGGATCGTTTTTCCGACCCGATGCGCT 329
Gamb. CYP6P3    TCCGGACCACTATCCCGACCCGGAACGGTTCAATCCTGATCGATTCTACCCGGAGGAAGT 1307
CYP6Z1         CGAGAAGTACTTCCCGAGCCGGAACGTACTCTCCGGAGCGGATTCGAT---GAGGCCAC 1259
CYP6P2         CGCCCACTACTATCCCGACCCGGAACGGTTCCGATCCGGAGCGGTTCCGGCCGGAGGTAGC 1301
CYP6M1         TCCGAGTCTGTTTCCCGAGCCGGAAGTTTCGATCCGGAACGTTTCAGTCCGGAGGAGGA 1274
Min. CYP6P7    TCCGGAATACTACCCGAACCCGGAACGTTTCGATCCGGAACGTTTCAGCCGGAGGTGGC 1307
                * ** * ** * * ** * ** * **
                R 5'-CCGTTCCGGCAGGGGCC-3'
Fun. CYP6P9      GAAGAAGCGACATCCCTTCACGTTCCCTCCATTCCGGTGAAGGGCCACCGCTTTGCAATTGG 1367
CYP6M8          AGCGAAACGTCATCCGTATGCGTGGACCDCGTTTGGCGAAGGCCCG----- 375
CYP6M7          AGCGAAACGTCATCCGTATGCGTGGACCDCGTTTGGCGAAGGCCCG----- 375
CYP6AA4        GCATAGCCGTCATACCCATGCGTTTCTGDCGTTTGGCGAAGGCCCG----- 375
Gamb. CYP6P3    GAAAAAACGACACCCGTTTACGTTTCACTCCATTCCGGCAGGGACCACCGCATCTGCATTGG 1367
CYP6Z1         AAAGAACTACGACGACAGATGCGTACTATDCGTTCCGGCCCGGTCCFCGCAACTGTATCCG 1319
CYP6P2         GAATGCACGGCCCGGTACGTGTACATGDCGTTCCGGCAGGGACCFCGCGCATCTGTATCCG 1361
CYP6M1         AGCGAAACGTCATCCCTTTGCTTGGACACDCGTTCCGGTGAAGGGCCFCGCGGTTTGCATCCG 1334
Min. CYP6P7    AAACGCACGTCACCCGTACGTGTACATGDCGTTCCGGTGAAGGCCCGFCGGAATTGTATTGG 1367
                * * ** * ** * ** **
Fun. CYP6P9      GCTTCGGTTTGGTGTGATGCAGACGAAGGTAGGATTGATAACGCTGTTGAGAAAATTCCG 1427
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4        -----
Gamb. CYP6P3    GCTGCGGTTTGGCTTGTATGCAAACCAAGGTGGGATTGATTACGCTGCTGAGAAAATTCCG 1427
CYP6Z1         TCTGCGCAAGGGTGTGTGTGTCAAAAGATTGCGCTAGTGATGATGCTGTCCCGATTAA 1379
CYP6P2         GCTGCGGTTCCGGCATGATGCAGACGAAGGTGGGCTGATCACGCTGCTGCGTCAGTTCCG 1421
CYP6M1         GTTCCGGTTCCGGATGATGCAGACGAAGGTGGGCTATTGCTCAGGGTTTAA 1394
Min. CYP6P7    GATGCGGTTTGGCATGATGCAGACCAAGGTGGGCTGATCACGTTGCTGCGCCAGTTCCG 1427

Fun. CYP6P9      CGATGTCGCCATAAACATACAGTATCTGGACAATGTGATAAACGAAACACTTCGCAAGTA 1130
CYP6M8          TGATGCGGTTGGTGGATATGAAATATCTGGATCAGATTCTGAACGAAAGCCTGCGTAAATA 152
CYP6M7          TGATGCGGTTGGTGGATATGAAATATCTGGATCAGATTCCGAAAGAAAGCCTGCGTAAATA 152
CYP6AA4        TGATGCGGTTGAAAGAAATGACCTATCTGGATCAGGTGATTAACGAAACCCCTGCGTATGTA 152
Gamb. CYP6P3    CGACGTGGTCATGAACATAAAGTATTTGGACAATGTGATTGACGAAACCCCTTCGGAAGTA 1130
CYP6Z1         CGATAACATCACCCGGATGAAATATCTGGATTTGTCGCTGAAGGAAACGCTTCGAATCTA 1085
CYP6P2         CGATGTAGTGTGGGAAACGGAGTACCTCAACTGGGTCGTTGGATGAAACGCTGCGCAAGTA 1124
CYP6M1         GCACGCTATCCACGACATGAAGTATTTGGATCAAATTTTGAAGAATCCCTACGCAAGTA 1097
Min. CYP6P7    TGACGTTGTGATGGGTATCGAATATCTGAATAAAGTCCGTTGATGAAACGCTTCGCAAGTA 1130
                ** * * ** * * * ** * ** * **
Fun. CYP6P9      CCCACCGGTAGAATCGTTGAGTGTGTCGCTGTTGACTATGTATCCAGGTACGAA 1190
CYP6M8          TCCGCCGTTGCCGGTGCATTTTCGTTGGCGAGCAAAGATTATCAGGTGCCGGGCACCAA 212
CYP6M7          TCCGCCGTTGCCGGTGCATTTTCGTTACCACCGCAAAGAAATATCAGGTGCCGGGCACCAA 212
CYP6AA4        TCCGCCGTTGCCGGCAGTGTATTCGTTGGCGACCCAGCCGTATGCGGTTGCCGGGCACCA- 211
Gamb. CYP6P3    CCCACCGGTGGAATCGTTAACCCGCGTACCGTCTGTGGACTATCTCATCCCCGGCACAAA 1190
CYP6Z1         TCCCGCCTTGGCTGTGCTGAATCGGGAGTGTACGATCGACTACAAAGTGCCTGGCAGTGA 1145
CYP6P2         TCCCGCCTTGGAAACCGGTTACCGGTGCGCCCGAGCATGATTACCCGTCCTCCGGCAGCGC 1184
CYP6M1         TCCTCCAGTTCGGATGCATTTCCGTTATGACGGCACAGGACTACCGGTCGCTGCACCGGA 1157
Min. CYP6P7    CCCGCCACTGGAATCGATCACACGGCTCCGGAACAAGATTACACCATCCCCGGTACGAA 1190
                ** * * * ** * ** * ** *
Fun. CYP6P9      ACATGTCATTCGCAACGA---ACGTTAGTGCAAATTCGGTTTACGCCATTCAACATGA 1247
CYP6M8          AAGCGTG---CTGGAAGCGGG-CACCGCGTGTGTTGCCGGTGCATGCGATTTCATCATGA 269
CYP6M7          AACCGTG---CTGGAAGCGGG-CACCGCGTGTGTTGCCGGTGCATGCGATTTCATCATGA 269
CYP6AA4        --ACGTGACCCCTGGATCGTGATAACATGCTGATGTTGCCGATTTATGCGATTTCATCATGA 269
Gamb. CYP6P3    GCATGTGATCCCGAAGCGA---ACACTGGTCAAATTCAGCCTACCGGATTTCAGCGCGA 1247
CYP6Z1         CACTGTCAATTCGCAAGGGC---ACGAGATGATTATCCCTCTGCTAGGGATTAGCATGAA 1202
CYP6P2         GCACGTCATCCCGAAGGGC---ACGATGATACAGATACCGATCTACCGGCTGCACACCGA 1241
CYP6M1         CTCAGTCATCCGAGCCGGC---ACGATGCTGTTTATACCGATCTTTCCATTTCAGCGGGA 1214
Min. CYP6P7    GCATGTGATCCCGAAGGGC---ACGATGTTTCAGATACCGATCTACCGGCTGCATCACGA 1247
                ** * * ** * ** * ** *

```

```

Fun.CYP6P9      TCCTGAGCACTGTCCCGATCCAGAACGTTTCGACCCGGATCGCTTCTCACCGGAGGAAGT 1307
CYP6M8          TCCGGCGGTGTTTCCGGATCCGGAACGTTATGATCCGGAACGTTTTAGCCCGGAACAGGA 329
CYP6M7          TCCGGAACATTTTCCGAACCCGGATCTGTTTGATCCGGATCGTTTTACCCCGGAAGAAGA 329
CYP6AA4        TGCGACCATTTATCCGGATCCGAAACGTTTGTATCCGGATCGTTTTGCGACCGATGCGCT 329
Gamb.CYP6P3    TCCGGACCACTATCCCGACCCGGAACGGTTCAATCCTGATCGATTCTACCGGAGGAAGT 1307
CYP6Z1         CGAGAAAGTACTTCCCGGAGCCGGAACGTGTAAGTCTCCGGAGCGGATTCGAT---GAGGCCAC 1259
CYP6P2         CGCCCACTACTATCCCGACCCGGAACGGTTTCGATCCGGAGCGGTTCCGGCCGGAGGTAGC 1301
CYP6M1         TGCGAGTCTGTTTCCCGAGCCGGAAGTTTCGATCCGGAACGGTTTCAGTCCGGAGGAGGA 1274
Min.CYP6P7     TCCGGAATACTACCCCGAACCCGGAACGTTTCGATCCGGAACGGTTCCAGCCGGAGGTGC 1307
                * ** * ** * * * ** * ** * **
                R 5'-CCGTTCCGGCGAGGGICC-3'
Fun.CYP6P9      GAAGAAAGCGACATCCCTTCACGTTCTCCATTTCGGTGAGGGGCCACGCGTTTGCATTGG 1367
CYP6M8          AGCGAAACGTCATCCGTATGCGTGGACCCGTTTGGCGAAGGCCCG----- 375
CYP6M7          AGCGAAACGTCATCCGTATGCGTGGACCCGTTTGGCGAAGGCCCG----- 375
CYP6AA4        GCATAGCCGTCATACCCATGCGTTTCTGCGTTTGGCGAAGGCCCG----- 375
Gamb.CYP6P3    GAAAAAACGACACCCGTTACGTTTATCCATTTCGGCGAGGGACACGCATCTGCATTGG 1367
CYP6Z1         AAAGAACTACGACGAGATGCGTACTATCCGTTCCGGCGCCGGTCCCGCAACTGTATCGG 1319
CYP6P2         GAATGCACGGCCCGGTACGTGTACATGCGTTCCGGCGAGGGACCGCATCTGTATCGG 1361
CYP6M1         AGCGAAACGTCATCCCTTTGCTTGGACACCGTTTCGGTGAGGGGCCCGCGGTTTGCATCGG 1334
Min.CYP6P7     AAACGCACGTCCACCGTACGTGTACATGCGTTTCGGTGAGGGGCCCGCGGATTTGTATTGG 1367
                * * * ** * ** * ** * **
GCTTCGGTTTGGTGTGATGCAGACCAAGGTAGGATTGATAACGCTGTTGAGAAAATTCCG 1427
-----
-----
-----
Gamb.CYP6P3    GCTGCGGTTTGGCTTGTATGCAAAACCAAGGTGGGATTGATTACGCTGCTGAGAAAATTCCG 1427
CYP6Z1         TCTGCGGCAAGGTTTGTGTTGTCAAAGATTGCGCTAGTGTATGATGCTGTCCCGATTTAA 1379
CYP6P2         GCTGCGGTTCCGGCATGATGCAGACCAAGGTGGGCTGATCACGCTGCTGCGTCAAGTTCCG 1421
CYP6M1         GTTGCAGTTCCGGATGATGCAGGACCGGATCCGGTTGGCCTATTTGCTGCAGGGTTTTAG 1394
Min.CYP6P7     GATGCGGTTTGGCATGATGCAGACCAAGGTGGGCTGATCACGTTGCTGCGCCAGTTCCG 1427

Fun.CYP6P9      CTTCTCACCGTCAGCCGCTACACCAGATTGTGTAAGTTCCGATCCGAAAATGATCATTCT 1487
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4        -----
Gamb.CYP6P3    CTTCTCGCCGTCGCGCGTACGCCGGAACGGGTAGAATACGATCCGAAAATGATAACCAT 1487
CYP6Z1         CTTTTCGGCCACC-----ATTCCGAGGAAGATAAAGTTTGAGCCCGTTTCAATCAGACT 1433
CYP6P2         ATTTTCGCCGACGGAGCAAAACGCTGACCGTATCCGGTTTATGCCGAACGTTTGTGCT 1481
CYP6M1         CTTTGCAGCGTACGAAAAAACTTCCATCCCGATGAAGTTTCATTACGAACAGTTTCATACT 1454
Min.CYP6P7     ATTTTCACCGACAGCGAAAAACCCAGAAAACGATCCGATTTATGCCGAACGTTTCATTCT 1487

Fun.CYP6P9      GTCACCGATCGCGGGTAATTACTTGAAGGTGAAAAAGTTGTAG----- 1530
CYP6M8          -----
CYP6M7          -----
CYP6AA4        -----
Gamb.CYP6P3    AGCGCCGAAAGCGGGCAACTACTTGAAGGTGAAAAAGTTGTAG----- 1530
CYP6Z1         GGCACCGAAAGGAGGCCCTTCCAATGAGGATCGAGAATCGTGTAAACATTAA----- 1485
CYP6P2         GTCGCCGACAGTGGGAACATCTGGAGGTGGAGAAGCTTTGA----- 1524
CYP6M1         GGGTCCGAGGGAAGGCTTATGTTGAAGGTGAACAAGCTGGAATCGAAGCAAGTTGA 1512
Min.CYP6P7     ATCCCGGACAGGGGAACTATCTGCATGTGGAGAAGATATAG----- 1530

```

Figura 32. Alineamiento completo de secuencias de mRNA de la familia CYP9 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador Forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. W: A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. Fun: *A. funestus*. Gamb: *A. gambiae*. Cx: *Cx. quiquefasciatus*. Aed: *Ae. aegypti*. Dros: *D. melanogaster*. Helio: *Heliothis virescens*.

```

Fun. CYP9M3      -----
    CYP9J14      -----
    CYP9J13      -----
    CYP9J12      -----
    CYP9J11      -----
Gamb. CYP9K1     -----
    CYP9L1       -----
    Cx.CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul    -----A 1
Aed. CYP9J1     -----ATCAGTAGTGTTACTTTTTCTCGTTCAACAATCACTTCA 38
    CYP9J2       -----ATCAGTAGTGTTACTTTTTCTCGTTCAACAATCACTTCA 38
    CYP9H1       -----
Dros. CYP9C1Dro TCTGTTGACTGGCGAAGTAGCTCTCTGAATTTTTTCGGAACCTCCACGGCTGCGCAGCTC 60
    CYP9B1Dro    -----
Helio. CYP9A1V2 -----AGATCACGCCAGTCAGTCACAGTCACGGT 29

Fun. CYP9M3      -----
    CYP9J14      -----
    CYP9J13      -----
    CYP9J12      -----
    CYP9J11      -----
Gamb. CYP9K1     -----ATGTTGGGTACGCTTGCCTCGCTGCTCTTTTC 32
    CYP9L1       -----ATGGAGATAAACTT 14
    Cx. CYP9C1Cul -----ATGGTCGTGGCACT 14
    CYP9B2Cul    TGATAACAGACGTGCTG---TGTGCGATTT-----GCAGCTGGATTGTGTCATCCA 49
Aed. CYP9J1     GTTTGCTTGGCCTACTGCGTATGTGGGACTTCTCTCTAAGAACATGGTCGAAGTAAACAT 98
    CYP9J2       GTTTGCTTGGCCTACTG---TGTGGGACTTCTCTCTAAGAACATGGTCGAAGTAAACCT 94
    CYP9H1       -----ATGGATCAGTCGAT 14
Dros. CYP9C1Dro GATTAGAGTCCCCTACTCCCTACTCCACGCTCCATCCCCAAAATCCCG-TCATGGTTTT 119
    CYP9B1Dro    -----CAGTTAGCATTAAATACATCAGGTGATAATAATGTCATT 38
Helio. CYP9A1V2 CACAACAAGTGGCGCGCGCCTGTCTGTGTCATTTGGTTTCTGTTTTTCTCGCAGCCAT 89

```

Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb.CYP9K1	GCTCGAGGGTGTCTGCTGGTGGCCCTGCTAGCCCTGCTCTACTACTATGTGGTGGTGGC	92
.CYP9L1	AATGTACGTTATTGGAATCGTATCGGTGCTGGTG---GCACTATACGTTTACCTAACGCA	71
Cx.CYP9C1Cul	GCTGATCACGTTAGCCTTGCAGCGCTTCTGCTGTACCTGTTGTACCCTGGAGCATCGC	74
CYP9B2Cul	ATTTGGTGGTACTGATTGTTTG--GCTCTAGTG---CTAGCATATCGTTTCGGATCCCA	104
Aed.CYP9J1	ATTCTCTGCTTTGGCTGTGGGCGCCGTAATCCTG---CTGCTGTATCATTACATAGCGAA	155
CYP9J2	ATTCTCTGCTTTGGCTGTGGGCGCCGTAATCCTG---CTGCTGTATCATTACATAGCGAA	151
CYP9H1	GATAGCACTCGCTTTGTTTATAAATACTGCTCGTTTTGCTC---TACAAAGTGGTGGTGGC	71
Dros.CYP9C1Dro	CGTGGAGTTGTCCGATATTCGTAGCCTTCATCGGTTTGCTATTGTACAAATGGTCCGTCTA	179
CYP9B1Dro	TGTGGAAATATGTCTCGTCTGGCTACCATCGGCTTACTATTGTTCAAGTGGAGTACTGG	98
Helio.CYP9A1V2	GATCCTGCTTCTAACATGGCTGGTGGTATCATCACAGCGGCTCTGCTGTACTTCCGAAG	149
Fun.CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb.CYP9K1	GAGCACGGGATTCTTTGCCGACCGGGGCGTACCCTACCTCCCGCCAGTACCCTGCTCGG	152
CYP9L1	CAACAACGATTTTCTTCAAGAAATACCCCATACCCTGCCTGCCAGTGGAACTTTTCGG	131
Cx.CYP9C1Cul	CACCTACGATTACTTCAAGCGGCGCGGTTCCGTTCCCAAAACCGGTCCTACTTTCGG	134
CYP9B2Cul	TAATCATGATTTCTTCAAGCAAGGAATACC-TGGTCCGAGACCCTTCCGTTTGTGG	163
Aed.CYP9J1	AAAGTATCACTATTTCTTACAAAACCGATACCATGCATCAAACCCACCTTCTGCTGGG	215
CYP9J2	AAAGTATCACTATTTCTTACAAAACCGATACCATGCATCAAACCCACCTTCTGCTGGG	211
CYP9H1	CAAATATGATGTGTTCAAGTAAAGGGGTGTGTCACATGAGAAGCCATGGCCTCTAATTGG	131
Dros.CYP9C1Dro	CACCTTCGGGTATTTCTCGAAGAGGGGCGTGGCCACGAAAAGCCAATTCTCTGCTAGG	239
CYP9B1Dro	CACCTTTAAGGCTTTTCAAGGGGCAAACTTATACTTCGAGAAACCGTACCCATTTTTAGG	158
Helio.CYP9A1V2	CGGTACAGCCAACTGTCCAAGCAGGGGTGAACCACTCCCAACAATCCAGTCTTCGG	209
Fun.CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb.CYP9K1	CAATGGGGCCGACTTCA---TAACGCGCAAGCGGCTGCTAACCCGATGTGCTGAGCGATAT	209
CYP9L1	TAG-CAGTCGCCAGTTTT--TGCTGAAAAAATTTTCATTAGCGAATTTGTTTCGCTCAA	188
Cx.CYP9C1Cul	CAACCTGTGGCCATTCTCT--GGCCGGCAAAACCCAGCGGCTTGAATCCGCCCTCGGCCGC	192
CYP9B2Cul	GAAACACGTGGCAGTGGC--TGCTGGGAAAAGTATCGTTCTTTGATGTATTTCAAGAGTT	221
Aed.CYP9J1	CATCTTCGATATGGTTG---TGTTGAAACGGGTTGAACTGGTTTTTCGGATCAAACTTCT	272
CYP9J2	CATCTTCGATATGGTTG---TGTTGAAACGGGTTGAACTGGTTTTTCGGATCAAACTTCT	268
CYP9H1	CAATATTCGGCTGAAAGCCATGATCGGTGGAATGCCAGTACTAAAGAAAATGATCGAATT	191
Dros.CYP9C1Dro	AAATATTCGGTGGTGGTGTGATGGGTAAGAGTGTACATAAAAACATAGCATTGACCT	299
CYP9B1Dro	TAACATGGCTGCATCGGCCCTTGCAA---AAAGCCTCATTCCAAAAACAATCTCCGAGTT	215
Helio.CYP9A1V2	GAACCTGATGTGGATGG---TCATGAAGCAGGAGCACTTTCGTTGATACCCTGGGGGGGTG	266
Fun.CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb.CYP9K1	GTATCACCG-TTTCGCCAGCCATCGGTTCTTCGGCTACTTCGACTTCTTTTCGCCGATCT	268
CYP9L1	CTACGAACG-ATTCCCGAATGCAAAAATGTACGGTATGTTTCGAGATGTTTACGCCGATGT	247
Cx.CYP9C1Cul	-TACTGGCA-GTTTTCCGGAGGCTCGCTTTTCCGGCTTCTTCAACTTTTCGCCGGCCGGCT	250
CYP9B2Cul	GTACCAGTC-GTTCAAAGAACACAACTGTTCCGGCTGTTTGACTTTCATGGGGCCAGTCT	280
Aed.CYP9J1	GTACAACCTC-CTATCCAGATGCCAAAATCATCGGCTACTACGAGCTGACGAAGCCAACT	331
CYP9J2	GTACAACCTC-CTATCCAGACGCCAAAATCATCGGCTACTACGAGCTGACGAAGCCAACT	327
CYP9H1	GCATACGAAACACACGGGATCCCCGG-TATATGGTATCTACGCCCTTCGAGATGCCGTCT	250
Dros.CYP9C1Dro	GCACTTGGC-CCTGAAGCAGCACAAGGTCTATGGAGTCTTCAACCTGGCGGATCCCTAT	358
CYP9B1Dro	CTATAATCG-CACTCGACATCACAACCTGGTAGGGCTCTTTAATCTACGCCACCCAAATGA	274
Helio.CYP9A1V2	TGTCAAAGC-TTTTCTGATGATAAGATAGTAGGACACTACGACATGGTGAGCCCTATCT	325

```

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 ACCTGGTGCAGATCTGGAGCTGGTGAAGCAGATCTGCATCAAGGATTTGACCACTTCG 328
CYP9L1 TTGTCATTCCGCGATCCGGAGCTGATCAAGCAGATCACGGTGAAGATTTGATCACTTTA 307
Cx.CYP9C1Cul ACCTGGTGCAGATCTGGACCTGCTGAAGCGCATTACGATCAAGGACTTTGACCACTTTG 310
CYP9B2Cul ATGTGTTGCGAGATTTTGATTTGGTGAACAGGTTTGCATCAAGGACTTTGACAGCTTTA 340
Aed.CYP9J1 ACATGGTGCCTGACCCAGAGATGATCAAGAAGATCGCCATCAAGGACTTCGACAGCTTCA 391
CYP9J2 ACATGGTGCCTGACCCAGAGATGATCAAGAAGATCGCCATCAAGGACTTCGACAGCTTCA 387
CYP9H1 TCTTTGTCGAGACCCTGAGCTCATCAAGCTCATCGGCATCAAGGAATTCGACCACTTCG 310
Dros.CYP9C1Dro ACTATCTCTCCGACCCGAACTCATTCCGCCAGGTGGGCATCAAGGACTTCGATACCTTCA 418
CYP9B1Dro TCCAGATAAACGACCCAGCTGATTAAGGATATGCGTTAAGGACTTTGACCACTTTC 334
Helio.CYP9A1V2 TGGTAGTTCTCGAGCTGGACACTGTCAAGAGGATCACCGTCAAGGACTTTGAACATTTTC 385

```

```

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 TCAACCACCGCATTTCAGCTGGACGAAAACCATGACCCGC-----TGTTCCGGGC 376
CYP9L1 TCAACCACCGCATTTCAGCTGGACGAAAACCATGACCCGC-----TGTTCCGGGC 367
Cx.CYP9C1Cul TGGACCACTCGTTTAAACGTGTACCCGGAGG--TGGACCCGT-----TCATCGGTC 358
CYP9B2Cul CTGATAGACGGTTTCAGTTCAACGAGGAG--TCGGATCCAC-----TGTTTTCTA 388
Aed.CYP9J1 CCGATCGAACACCGGTATTGCGCGATGCGGTTCCCGCCGACAGTT-----TGTTCTTCA 445
CYP9J2 CCGATCGAACACCGGTATTGCGCGATGCGGTTCCCGCCGACAGTT-----TGTTCTTCA 441
CYP9H1 TTAACCACAATAG-----CATGCACAACAATA--TACAGGAGTCGA--TACTCTCGA 358
Dros.CYP9C1Dro CCAACCATCGCAAGGGGATAAAGGATTCAACGATACCAGCGTGA---TTTCCAAGA 475
CYP9B1Dro CCAACCACCGAC-----ACTGAATATCCCTA---ACGAGCGTC---TAGTTAACG 379
Helio.CYP9A1V2 TTGACAGGCGAAGCT---TCACCAGCAGCTTTGATCCCA-----TCTTTGGAA 430

```

```

Fun.CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GGGCCCTGTTTGGGATGCGCGACACCGCTGGCGCAACATGCGCACTATCCTTAGCCCGG 436
CYP9L1 AAATACTTTTCAATCTTACTGGTCAACGGTGGCGTAAACGTGAGGACCACACTTAGTCCCA 427
Cx.CYP9C1Cul GTTCGCTGTTCTTTTCCGAGGACTTCGCTGGCGGCATGGCCGGGCGGGGCTTAGTCCCG 418
CYP9B2Cul ACGCTTTGTTTGCAATTAAGGGGACACGATGCGGGAATATGAGAGCGATCCTTAGTCCCG 448
Aed.CYP9J1 ATTCGTTGTTCTCGCTCCGTGGACAGAAAGTGGCGGATATGCGGTTCAACTCTGAGTCTC 505
CYP9J2 ACTCGTTGTTCTCGCTCCGTGGACAGAAAGTGGCGGATATGCGGTTCAACTCTGAGTCTC 501
CYP9H1 AAAGTCTCATTTCGCTGCGCGATGGTTCGATGGAAGGAGATGCGCAATATCCTGACACCCG 418
Dros.CYP9C1Dro GCTTGCTCAGTCTGC---GGGATCGTGGTGAAGCAAAATGCGCAGCACCTGACCCCTA 532
CYP9B1Dro ACATGCTCAATGTGATGAGGGATCAGCACTGGAGGAACATGAGGAGCGTCTGACCCCGG 439
Helio.CYP9A1V2 GAGGGCTGCTGTTGCTACATGCTGACGAATGGAAGCAATGCGGTTACGATGAGTCCAG 490

```

F 5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'

```

Fun.CYP9M3 --TTACCGGCAGCAAAAATGCGTAGC-ATGTTTGGCCTGCTGAG-----CAAAAGCG 50
CYP9J14 -----GCCAAAATGCGTAGC-ATGTTTGGCCTGCTGAG-----GGAATGCAG 41
CYP9J13 -----CAG--ATGTTTGAAGTATGAG-----CGAAAGCTG 29
CYP9J12 --TTACCGGCAGCAAAAATGCGTCTG-ATGTTTGGCCTGATGAG-----GGAATGCGG 50
CYP9J11 --TTACCGGCAGCAAAAATGCGTCA-ATGTTTGAAGTATGAG-----GGAATGCAG 50
Gamb.CYP9K1 CCTTACCGGCAGCAAGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----GAGCTACTG 488
CYP9L1 CGTTACCGGCAGCAAGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----GAGCTACTG 479
Cx.CYP9C1Cul CGTTACCGGCAGCAAGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----GAGCTACTG 470
CYP9B2Cul CTTTACCGGATGCAAAAATGAGAGGA-ATGTTTCCAGTTATCAC-----TGATTATTG 500
Aed.CYP9J1 CTTTACCGGAAAGTCTGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----CAAATGTGC 557
CYP9J2 CTTTACCGGAAAGTCTGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----CAAATGTGC 553
CYP9H1 CATTTACCGGAGCAAAAATGCGGATA-ATGTACGACCTGATCCA-----ATCGTGCAG 470
Dros.CYP9C1Dro CTTTACCGAGCTCAAAAATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----TTTCTGCAA 584
CYP9B1Dro TCTTACAGTTCGCGCAAGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----TTTCTGCAA 498
Helio.CYP9A1V2 CGTTACCGAGCTCAAGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----GGAGATGCG 542

```

*** *

Fun.CYP9M3	CATTCCGAAAGTGTIT---CGTITTTCTGCGT-CTGAGCGGCATGTATAAAGATGTGAACG	328
CYP9J14	GTTTCCGTGGATTATG---GAAAACTGGAAGTGGATCTGTTTG-ATCGTGAACCTGAACA	322
CYP9J13	NATGCCCGCGTGTGATG---CTGAAACTGAACTTGAACCTG-ATGGATAAAGAAATGTGCC	316
CYP9J12	TGCGCCGAAACTGATG---NNNCGTCTGAACATTGATTTT-CTGACCCCGGAAGAAAAAC	340
CYP9J11	GGTGCCGAAACTGATG---AACTGGNNNNNCTGGATCTGTTTG-ATCGTGAACAGGGCG	340
Gamb.CYP9K1	CTTTCCGCGCGTGTGATG---CGTGCGCTTCGATTGCGTCTGTTTAGCGCG-AAGATGACCA	769
CYP9L1	GTTTCCCAAGCTAATG---GCACAACCTACAGATG-GACATATTCGATAGCACACACGTAC	751
Cx.CYP9C1Cul	GATTCCCGCGAGGTGTTTCATATTTTTGGGATTGCGACTGACCCCGCGTGCAGTTGCCGA	743
CYP9B2Cul	GTTTCCGCGACTAGCA---AAAACTCTACGAATTCGACTGTTTG-ACCAAATGACTACGG	781
Aed.CYP9J1	GTCCCATF--TTTGCA---AAAAGTATTCAAATTCGATTTTCGTGGACGCGAATGTGGCAG	841
CYP9J2	GTCCCATF--TTTGCA---AAAAGTATTCAAATTCGATTTTCGTGGACGCGAATGTGGCAG	837
CYP9H1	CTTTCCACGACTGATG---AAGGTTCTCCGCATCCAGGTG-CTGGACACCAAGAACATTG	757
Dros.CYP9C1Dro	GATGCCAAAAATTGATG---AAGGCATTCGGGTCCCGGTG-ATGGACATGAATAACGTGG	862
CYP9B1Dro	TGCTCCGAAAGTTTTT---AATTTTTCAAGCTGACTATC-TTTGACTCCACCAATGTTG	781
Helio.CYP9A1V2	CCTGCCGAGTGTGCT---CAGAAGCTGAAGATGTCTATTG-GTGCCACGTGAGTGTTCAG	826
	*	
Fun.CYP9M3	AATTTTTATCTGGATGCGGTGAGCCGTAACATTAACCTGCGTGAACCAACCGTATTACCC	388
CYP9J14	GCITTTTTGCGGAAATTTGTGCTGGAAACCGAAAAACCCGTGAACCTGCAGGGCATTGTGC	382
CYP9J13	AGCATTTTTATGCGGATGATTATGGATAACATGAAAGTGCCTGAAGAAAAAGGCATTGTGC	376
CYP9J12	GTTTTTTTTNMNGATACCATTCTGGAAACCATGCGTACCCGTGCGGATAAAGGCATTTTTT	400
CYP9J11	ATTATTTTACCAGAAATTTCTGATACCCCTGAAAAACCCGTGAAGCGCATGGCATTGTGC	400
Gamb.CYP9K1	GCITTTCTCCGACAGTGGTATGATACAATCAGCGAGCGTGAACAGCGCGGATCCGTGC	829
CYP9L1	AGTTCCTCACCAGAAATGTTTAGGCAGTCTGTTTCAAGAGCGAGAGAGAGATGATTGTGC	811
Cx.CYP9C1Cul	CTTTTACGAGGACATCCTTTATCCACCTGTTGA-----	777
CYP9B2Cul	ATTTTCATGAGAGAAGCAGTTCGTATCGTAATTGAACAGCGTGAAGAAACAATGTTGTGA	841
Aed.CYP9J1	GTTACTTCAAAAAGTTGATTTTGGATAAATATGGACCAGCGCAATAAGCAAGGTATCGTTC	901
CYP9J2	GTTACTTCAAAAAGTTGATTTTGGATAAATATGGACCAGCGCAAAAAGCAAGGTATCGTTC	897
CYP9H1	ATTACTTTCAGCAGCCTGGTCCCGCGGATGAGGTACCGCCAGGAGCACAAGTGGTTA	817
Dros.CYP9C1Dro	ACTACTTCAAAAAGCTGGTCTTCGGTGCCATGAAAGTATCGAAAGGAGCAGAGTATCGTGC	922
CYP9B1Dro	AGTACTTTGTACGCCCTGGTGGTGGATGCTATGCAAGTACCGGGAGAGAACACAATATCACC	841
Helio.CYP9A1V2	ACTACTTCTCAAAATGTGGTGTGACCAGGATGAAGGACAGAGAGAGAAACAAGGTCTGAC	886
	*	
Fun.CYP9M3	GTCCGGATTTTATTCATCTGCTGCTGCAGGCGCGTAAAAACACCCTGGGCGCGGAAAAAC	448
CYP9J14	GTCCGGATATGATTCATCTGCTGATGCAGGCGAAAAAAGGCATTCTGAAACCTCATAAAG	442
CYP9J13	GTAACGATATGATTAACATTTCTGATGCAGGTGAAACCTGGCATGCTGAGC---CATCAGC	433
CYP9J12	GTCCGGATATGATTTGAACTGCTGATGCAGGCGAAAAAAGGCAGCCTGAAACATCAGCAG	460
CYP9J11	GTCCGGATATGTTGAACTGCTGATGCAGGCGCGTAAAGGCACCATTAACAGCTGAAACAG	460
Gamb.CYP9K1	GCCACGACATGATCAATCTTCTGATGCAGGCGCGCAAGCAGGAGCTGCGGTTCCAGCAGA	889
CYP9L1	GACCCGATTTGATCCATCTGCTCATACAAGCTCGTAAGGGTCAAGTACGATATCAACCCG	871
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	GACCAGATTTGATTCATCTGCTGATGCAAGCTCGTGATCAGAAGCTGAAATTTGGTGTATT	901
Aed.CYP9J1	GAAACGATTTGGTGAACATGTTGATGGAAACGAAAAATGGTGCCTTGAAGTACGAAGAGC	961
CYP9J2	GAAACGATTTGGTGAACATGTTGATGGAAACGAAAAAGGTGCCTTGAAGTACGAAGAGC	957
CYP9H1	GGCCGGATATGATCCACCTGCTGATGGAGGCAAAAGCAGCAGAGGCTTGCCGATCTGAGT	877
Dros.CYP9C1Dro	GGCCCGATATGATTCATTTGCTGATGGAGGCGCAGAGACAGTTTAAAGCAGAGCAAGAAG	982
CYP9B1Dro	GGCCCGACATGATCCAGCTTCTGATGGAGGCAAGAAAGGAGTCAAGG-----	889
Helio.CYP9A1V2	GAAATGACCTCATCAACATTTCTGATGGAAGTGAAGAAAGGTCAACTGACTCACGAAAAAG	946
	*	
Fun.CYP9M3	ATGATGATGAAACCCTGCAGGATGC-----GGGCTTTAGCACCCGCGCAGACCCATG	499
CYP9J14	AACAGGAAGAAAGCCTGGCGGA-----AGGCTTTGCGACCCGCGCAGGAAAGCG	490
CYP9J13	GTGATGAACCGGATGTGAAAGATGC-----GGGCTTTGCGACCCGCGCATGAAAAGCG	484
CYP9J12	CGGAAGAACCAGAAACAGGAAMNNGCACCGGCGATGGCTTTGCGACCCGTGGAAGAAAGCC	520
CYP9J11	GTGAAACCGAAGATCTGTGAAGAAAGTGA-----AAGGCTTTGCGACCCGTGGAAGAAAGCG	514
Gamb.CYP9K1	ACGAAAAACA-----TCGAAAC-----GAACGGTGGCGGGTCCGAGAACGGGT	931
CYP9L1	AAGAATCGGAGGAAACCGA-----TGGTTTTGCAACAGCAAAAGGAGTCCA	916
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	TTGAT-CGAGAATCTGAGG-----TGAAT-----ACTGTCCAGGAA-----	936
Aed.CYP9J1	AGGACACCGCAGGTCCCAGA-----GGGTTTCCGCAACAGTTGAAGAATCCG	1006
CYP9J2	CGGACTTGCAGGTCTCAGA-----GGGTTACGCAACAGTTGAAGAATCCG	1002
CYP9H1	ATAAGTCGAAGGA-----TGAGCTATACTATTCC---	906
Dros.CYP9C1Dro	GATCTGCGGAGAGTGCAGC-----ACAGCAGGATAAGGCC---	1017
CYP9B1Dro	-----ACAACCTGGACG-----	900
Helio.CYP9A1V2	ATGACGCCGAAG--CTGACGC-----TGGGTTTGAACAGTAGAAGAGTCA	991

Fun.CYP9M3	CGGTGGAA---CAGAAAAGCGAAGGCAAACTGAGCTGGGAAGATATTGATATTGCGGGCG	556
CYP9J14	ATGTGGGCGCGGTGGATAGCCAGCATTATCAGACCATGACCCAGATTGGA-ACTGGTGGCG	549
CYP9J13	CGGTGGG----CAAAAAGCGATTACCCGTGAA--TGGAGCGAAAAAGA-ACTGGTGGCG	537
CYP9J12	ATGTGGG-----CGTCGTGCGCATGATCGTGTGTGGAGCGATNMNGA-ACTGATTGCG	573
CYP9J11	ATGTGGG---CAGACCGGCAAAAGGCTGCAGA---TGACCGAACTGGA-AATGGTGGCG	567
Gamb.CYP9K1	CGGTTGAC-----TGGACCGACGACGA-CCTAACCGCC	963
CYP9L1	ATGAGCAGAAGATTCTTCCGGGAAGATATGGTGAAGCTCAGCGAGAATGA-AATGATAGCA	975
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	-----GTCAG--T-TAC---ACACC---AAATTGGACCCACGACGA-CCTCGTATCA	978
Aed.CYP9J1	ACGTAGGCAAA--TCTAC---ACATTCCAGGATTTGGACGGACAACGA-GCTGATATCG	1059
CYP9J2	ACGTAGGCAAA--TCTAC---ACATTCCAGGATTTGGACGGACAACGA-GCTGATATCG	1055
CYP9H1	-----GAGTTCACCCCGCATGA-CTTGCTGGCC	933
Dros.CYP9C1Dro	-----GAATTCAACGATGACGA-CTTGCTGGCC	1044
CYP9B1Dro	-----GACGATGA-GATCGTGGCT	918
Helio.CYP9A1V2	ACATTGGT-----AGAAAGCAACACAATTATGAATGGACAGACTCGGA-CCTAATAGCG	1044
Fun.CYP9M3	CGACCGCGAGCTTTTTTTTTTGGCGG-CATTGAAA-CCACCACCACCTGTGTGCTTTGC	614
CYP9J14	CAGTGCCTGATTTTTTTTCTGGCGGGCTTTGATA-CCGTGGCGAACTGCCTGACCTTTCT	608
CYP9J13	CAGTGTCTTCTGTTTTTCTGGCGGGCTTTMNNA-CCATTAGCACCGCGCTGGCTTTCT	596
CYP9J12	CAGGCGTTTATTTTTTTTTTGGCGGGCTTTGAAA-CCATTAGCTGGACCTGAGCTTTGC	632
CYP9J11	CAGTGCTGATTTTTTTTTCTGGCGGGCTTTGATA-CCGTGAGCACCTGCCTGACCTTTCT	626
Gamb.CYP9K1	CAGTGCACCGTGTTTTTTCTTGGCGGGTACGATA-CCGTGTCCACGTTGTCTGCATTTAT	1022
CYP9L1	CAGTGTCTGCTGTCTTCTTCTGGCTTCGACA-CAATCGCAACATCGATGACATTTGT	1034
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	CAATGTGCCGTAITTTGTATTTGGTGGCCTTGACA-CCGTGACAAAATATTGCTCTTTTCA	1037
Aed.CYP9J1	CAGTGTCTTCTTTTTTCTTTGCCGATTTCGATA-ACGTATCCAGCATCTGACTTTCT	1118
CYP9J2	CAGTGTCTTCTTTTTTCTTTGCCGATTTCGATA-ACGTATCCAGCATCTGACTTTCT	1114
CYP9H1	CAGTGTCTGCTATTTCTTTTGGCGGGCTTTGAGA-TTATCTCGTCTCTTTGTGCTTCT	992
Dros.CYP9C1Dro	CAGTGCCTCTTGTCTTCTTCTGGCAGGATTTCGAAA-CAGTGGCCACTGCTTACTGCTTCC	1103
CYP9B1Dro	CAGTGTCTTCATTTTTCTTCTTGGCGGGCTTCGAAAAACAACCTCAATCTGATCT-GTACCAC	977
Helio.CYP9A1V2	CAAGCAGCGTTATTCTTCTTCTGGCGGGCTTCGACA-CGGTTCCACATCCATGTGCTTCT	1103
Fun.CYP9M3	GAGCTATGAACTGAGCATTAAACCCGAGCATTAGGATCGTCTGCGTGGGAAATTGATGA	674
CYP9J14	GGCGTATGAACTGACCCGTAACCCGTGATATTGAGGATCGTCTGTATGAAGAAATTGTGGC	668
CYP9J13	GGCGTATGAACTGATGCTGCATCCGGAAGTGCAGGATCGTCTGTATGAAGAAATTGTGGC	656
CYP9J12	GCTGTATGAACTGGCGGTGAACGATGATATTAGMNNCGTCTGTTTTGAAGAAAGTGCATGA	692
CYP9J11	GGCGTATGAACTGACCCGTAACAAAGATGGCAGAACAACTGTATGAAGAAATTGCTGC	686
Gamb.CYP9K1	GGCGCACGAACTGCGCGTCAACCCGGACGTCGAAGAGCGGCTGCGGACGAGATCGACCG	1082
CYP9L1	ACTGTACGAAAGTGACGCTAGCACCGGAAATCCAGCAGCGTCTGTACGAGGAGATCCAACA	1094
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	GGCCCATGAATTGGCCATTAATCAGCACGTCAGGTCAAATTACGCGAAGAAATCGAGTC	1097
Aed.CYP9J1	GTCTTATGAGCTTACCCTCAATCAGGATATTCAACGACGCTCTACGAAGAAATTGACGT	1178
CYP9J2	GTCTTATGAGCTTACCCTCAATCAGGATATTCAACGACGCTCTACGAAGAAATCGACG	1174
CYP9H1	CACCCATGAACTCTGCTTGAATCCACGGTGCAGGACAGGTTGTATGAGGAGATCATTTC	1052
Dros.CYP9C1Dro	CAGCTACGAACTTATGATGAACCCCGAAGTGAAGAAAAATTGCTCGCGGATCTCTGGC	1163
CYP9B1Dro	CGCTACGAACTGCTTCGCAATCTCGACATCCAGGAGCGCTTATATGAAGAGGTTAAGGA	1037
Helio.CYP9A1V2	GCTGTACGAATTGGCAGTCAACCCGTGACGTACAGGACAGGCTGCTGCAGGAGATTAGGGA	1163
Fun.CYP9M3	AACCCGTGAAGAACTGGAAGATGGCAAAACCCCGACCTATGAAATTCTGCAGAAAATGAA	734
CYP9J14	GACCGATATTGATCTG--CAGCAG-AAACCGCTGACCTATGAAGCGCTGCAGCATATGAA	725
CYP9J13	CGTGGATGAAAACTG---AACGGCAAACCGCTGAACTATGAAGCGGTGCAGGGCATGCG	713
CYP9J12	AAGCGAACAGAGCCTGGAAGAAGGCAAAAGCCTGAGCTATGAAAACTGCAGAGCCTGCC	752
CYP9J11	GACCAGCAAAAGCCTG---GGCGCAGCAGCCTGACCTATGATGCGCTGCAGAACATGCA	743
Gamb.CYP9K1	CGTGCCTCAACGATCGGCAGCGCCGACAAGCTTAACTACGAAACGCTCCAGTCAATGCG	1142
CYP9L1	AGTTAGCGAGACATTG---GATGGCAAAAGCGCTCACCTACGATGCTCTGCAGGGTATGCG	1151
Cx.CYP9C1Cul	-----	
CYP9B2Cul	CATATTGAACGATAGA---GATGGACAATCAGTCACTTATGAAGACATTTCACTCCATGGT	1154
Aed.CYP9J1	AACCGAGTCAACCTC---AACGGCAAACCGATAACCTACGAAGCTCTTCAGAAAGATGGC	1235
CYP9J2	AACCGAGTCAACCTC---AACGGCAAACCGATAACCTACGAAGCTCTTCAGAAAGATGGC	1231
CYP9H1	CGTGCACGAAGAGCTG---AAAGTCAACCCCTGACCTATGACAAGCTGACCAAGATGAA	1109
Dros.CYP9C1Dro	CGTAAAGGAGCAGCTG---GGTGAGAAGCCACTAGACTACGACACCCCTGATGGGCATGAA	1220
CYP9B1Dro	AACCCAAGAGGCACTA---AAGGGTGCACCCCTCACTTACGACCGCGCAGGAGATGAC	1094
Helio.CYP9A1V2	GTATGATGAGAAG-----AACCATGGGAAGATTGATTATAATGTCTTCAGAGCATGAC	1217

5'-GAYATGGTYGTRTCGGARACRCT-3'

R

Fun. CYP9M3	ATATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG-----	765
CYP9J14	ATATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG-----	756
CYP9J13	TTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG-----	744
CYP9J12	GTATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG-----	783
CYP9J11	GTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCTG-----	774
Gamb. CYP9K1	CTATCTGGACATGGTCCGGAACGAGACGCTCCGCAAGTGGACACCGGCACCGTTCCTCGA	1202
CYP9L1	GTATCTCGATATGGTTGTATCGGAAACGCTACGCAAGTGGTCACCATCACCAGGTACCGA	1211
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	GTA CT TGGACCAAGTTCCTTACAGAACTCTTCGCAATGGCCCCAGGCGATTTCATCGA	1214
Aed. CYP9J1	CTACTTGGATATGGTTGTATCGGAGACTCTTCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1295
CYP9J2	CTACTTGGATATGGTAGTATCGGAGGCTCTTCGTAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1291
CYP9H1	GTATCTGGACATGGTGGTACTCGAAGCACTCGGTAATGGCCACCATCGATTTCACCGA	1169
Dros. CYP9C1Dro	ATATCTGAACTGCGTGGTGTCCGAGTCCGCTGAGAAAAGTGGCCACCGCGCTTCATCGTGA	1280
CYP9B1Dro	CTACATGGACATGGTCACTCCGAGTCCCTTCGAAAAGTGGACCCCTTCGGCAGCAGCAGA	1154
Helio. CYP9A1V2	GTATTTGGATATGGTGGTTTCTGAGGGACTCCGATTATGGCCCCAGCTGCAGTTGTAGA	1277
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	CCGCACCTGCACCAAAACCGTACATGCTGGAGGACTATGACGGCCGGCGGGTGCAG----	1257
CYP9L1	TCGAATGTGCAACCAAGACTATACTATTCCCGGTGAT-----CCAGACATCGTT-----	1260
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	TCGCGTCTGTACAAAACCGTATGATCTGAACGTTGATGGTCCGAATG-ATTTCGC-----	1267
Aed. CYP9J1	CCGTTACGTCAACAAGGACTACGTCTTCGATGACGAAGAAGGACTGCGCTTCGTC-----	1350
CYP9J2	CCGTTACGCCAACAAGGACTACGTCTTCGATGACGAAGAAGGACTGCGCTTCGTC-----	1346
CYP9H1	TCGTGAGTGCCGCTCAGGATATTGATTTGTTTCGATGAAAAATGGTCAGAAAGTTGTTCTC	1226
Dros. CYP9C1Dro	TCGAATGTGTGGTCTGATTTCCAGTTGAAGGATGAGGAAGGCGAGGTGGTGTAA--	1337
CYP9B1Dro	CCGGCTCTGCGCCAAGGATTACACGCTCACAGATGATGAAGGCACCAAGCTTTTCGA--	1211
Helio. CYP9A1V2	CAGAGTCTGTGTAAGACTACAATATTGGAAGACCCAATGAACAGGCTACAAAAGATT	1337
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	----CTGCAGCCGGGTGACGGTCTGTGGATACCGGCCGGGCCATCATGCGCCACCCGCA	1313
CYP9L1	---ATTCCCAAGGGTGTACCGTGTATTATCCCGATTGCTGGTTTGCATTATGATCTCG	1316
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	----TGAAGCAAGGTGACACAATTTGGATCCCGGCTCTTCCTATGCACCGAGATCCTCG	1322
Aed. CYP9J1	----ATCGAAAAGGGCAAAACCATTTGGATCCCAATGCTAGCCCTTCACCACGACCCGAA	1406
CYP9J2	---ATCGAAAAGGGCAAAACCATTTGGATCTCAATGCTAGCCCTTCACCACGACCCGAA	1402
CYP9H1	---CGCCCGAAAAGGGTGTGTCTTGCAAAATACCTATCTTCTCGCTCCATCAGCATCCCGA	1283
Dros. CYP9C1Dro	---CCTGCGGGAGGACGACTTAGTGCACATCAACGTTGGGGCACTTCATCAGCACCAGG	1394
CYP9B1Dro	---GTTTAAGGCAGGGATAATATAAACATTTCCATCTGTGGGTTGCACTGGGATGAGCG	1268
Helio. CYP9A1V2	GATTATTTCATACCGCCAGGCTGTGGCAATATCTCCCTGGTTGTTCCACAGGAACCCGAA	1397
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	GCTCTTCCCTGAGCCGGATCGGTTCTGGCCGGAGCGGTTCCGAGCCGGAATCGGCCGGTGC	1373
CYP9L1	TTTTTATCCAGATCCAGATCGTTTCGATCCAGAACGTTTCAATGATGAG-AATAAGCACA	1375
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	CTACTTCTCAGATCCGGAAGTTTTGATCCAGATAGATTTGCTTTCAGAT-CGGCG--CGA	1379
Aed. CYP9J1	GTACTTCCCGGAGCCGGAACGTTTCGATCCGGAGCGCTTCAGCGAAGAC-AACCGATCGA	1465
CYP9J2	GTACTTCCCGGAGCCGGAACGTTTCGATCCGGAGCGCTTCAGCGAAGAC-AACCGATCGA	1461
CYP9H1	GAACTTCGAGGATCCGGAGTTCTTCAATCCGGAGCGCTTCGAGATGGT---CAT-----	1335
Dros. CYP9C1Dro	TAACTTCCCGGAACCCGAGCAATTCGACCCGAGCGCTTTGACGAGGAG---CACAAAGCA	1451
CYP9B1Dro	CTTCTTTCCCGAACCCGAGGTTTGACCCAGAGCGATTTAGCGAAAG---CGTAAAAA	1325
Helio. CYP9A1V2	GTTTTTCCCGAACCCGCAAGTTCGACCTGAAAAGTTTCTACCAGAA---AACAGACA	1454

```

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GGAGGCGGGCCCCCGCACTCAGCACCCGATC-CGGCTGAAAGAAAGTCCAGCCTGGGACCCT 1552
  CYP9L1 TAAACGCTCCGAGCGTACCTCAGTTCCGGTT-AAGCTGGCAAAAAGGATTTTCCCCTACTGA 1552
  Cx.CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul AACACGATCTGACAAGACTCAACATCCACCA-AAGCTGGGTAAAAGTCTCATGATTCCGG 1558
Aed.CYP9J1 GCAAGCGTTCGGAGAAAACGCAGATCCCGCTG-CGGCTGTCCAAGAGTGCCTTCACTATGC 1642
  CYP9J2 GCAACCGTTCGGAGAAAACGCAGATCCCGCTA-CGGCTGTCCAAGAGTGCCTTACCATGC 1638
  CYP9H1 ATTGCCAGCTAAAAGGACTTCTCGCGATTGCTGAACGACA-TAAGGGGTATGGTTTGA 1513
Dros.CYP9C1Dro GAAGCCTACGGATCGCACTCCGGCGGACATGATGAGCAGCATCTCCGGTTTCCGACTGCT 1631
  CYP9B1Dro TGAGGCGTCACCGAGAACCACCAGGGATATG-TGGGAATCAGCACGAGGGTTCAATATAA 1504
Helio.CYP9A1V2 ATACCCCTTCGAGAAGACAATATATCCTCCA-CAGTTGTCTAAAAGCCGATTTAAACATGC 1633

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GCGCCGAGAAGGGGTCGTGGATACGGTTCCGGTTGCGCAAAGTAG----- 1596
  CYP9L1 AACCGGAAAAATGGCATGTACCTGAAAGTTTAAATCCAAGGATGAAGAATTAA----- 1602
  Cx.CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul AAGTAAAAGATGGATACTGGCTGAACTGAAATTGAGGAAATAA----- 1602
Aed.CYP9J1 AAGCGGAAAAATGGCGTTTGGCTGGAAGTGAAGGCTAGACCGAAAAGCTTAGACCAAATGAT 1702
  CYP9J2 AAGCGGAAAAATGGCGTTTGGCTGGAAGTGAAGGCTAGACCGAAAAGCTTAGACCAAATGGT 1698
  CYP9H1 AGCCGAAGAATGGCTTCTGGCTGAAAGTTCGAGGCACGTCATAA----- 1557
Dros.CYP9C1Dro GCCCCGGGAGCTG-TTCTGGTGCAAAGTTGGAGTCCCGTGGACCCGCTTAATTTAAAAACAC 1690
  CYP9B1Dro TTCCTACGACCGGATTCTGGATGCAGTTGGTGTCCGCTAAATAGGATGATGAAAAATCGA 1564
Helio.CYP9A1V2 ACTTAGAGGGAGGCGCCTGGGTCCAGGCTTCGAGTTCCGCTCCAGAAAAATCTTAATTAGGTG 1693

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 ACCGGTCGACTCGTCCGCTATGCTGGCATTCCGGGCTCGGCCCCCGTAACTGCATCGGTTTC 1433
  CYP9L1 AAATTCGCTCGGAGCATATCTCCCG--TTTGGGATAGGACCTCGCAATTGCATAGCGTTC 1433
  Cx.CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul TGACCTGGGCGATTTTGTCTTATGGCTTTTGGGATTGGCCCTCGGCTATGCTTGGGTAA 1439
Aed.CYP9J1 AAATCGTTCGGGTACGTATCTTCCG--TTCGGGGCAGGACCTCGAAGCTGCATTGGACC 1523
  CYP9J2 AAATCGTTCGGGTACGTATCTTCCG--TTCGGGGCAGGACCTCGAAGCTGCATTGGACC 1519
  CYP9H1 -GCTCTAGAGTCCCGTGTITACATGCCCTTCGGAGTGGGTCTCCGCAACTGCATTGGCAA 1394
Dros.CYP9C1Dro CGAGATCCGGCAGTTCACGTACTGCCCTTTGGAGTGGGCCAACGAAAGCTGCATAGGCAA 1511
  CYP9B1Dro AGATTTGATACCCTACACATATTTGCCATTTGGAGTCCGACCCCGAGCTGCATTGGAAA 1385
Helio.CYP9A1V2 CAAAATCCAACCTTTTACTATTTTTCTTTGGCCTGGGGCCAAGGAATTGTATCGGTTTC 1514

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GCGGTTCCGGCTGATGGAGACGAAGGCGGTGTTTTTCTTCTGCTGACGCACTTCCTGCT 1493
  CYP9L1 CCGCTTTGCTCTGATGGAGGTGAAGGCCATCGTGTATCATATACTGTTAAACTATGAGCT 1493
  Cx.CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul TCGATTTGCTTTGATGGAGATCAAAACCATGTTTTTCTGGCTTCTAACAAAGTTCCGAGTT 1499
Aed.CYP9J1 GAGGTTGGCACTGTTGGAGGTCAAAATGGCTCTGTACCACCTGGTCAAAGATTTCACCT 1583
  CYP9J2 GAGGTTGGCACTGTTGGAGGTCAAAATGGCTCTGTACCACCTGGTCAAAGATTTCACCT 1579
  CYP9H1 TCGAATGGCACTGATGGAGTCAAAATCAATAGTATACCAGTTGCTTTTAAATTTCAAAC 1454
Dros.CYP9C1Dro CCGGCTGGCTCTCATGGAGGTGAAGTCCCTGATCTTCCAGTTGGTCTGCGCTACCACCT 1571
  CYP9B1Dro TCGCTATGCTGTGATGCAGGCCAAGGGTATGCTCTACAATCTAATGCTAAAATTACAAGAT 1445
Helio.CYP9A1V2 TCGTTTCGCACTTTTGAAAATCAAAGTAATACTGTACTGCTCATTCCGGGAGATGGAAGT 1574

```

```

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 -----
  CYP9L1 -----
  Cx.CYP9C1Cul -----
  CYP9B2Cul -----
Aed.CYP9J1 GGAATGGGTTTATCTACTGGCTCTGATGGCTATAGCGCAAAGTTATCTTATCAATTCTTC 1762
  CYP9J2 GGAATGGGTTTATCTACTGGCTCTGATGGCTATACCGCAAAGTTATCTTATCAATTCTTC 1758
  CYP9H1 -----
Dros.CYP9C1Dro GCCCCAGACACACATAAATATTAATAAAGCGAGAGA-AACGAAACAAAA----- 1740
  CYP9B1Dro ATTCC-----GCTCATATTGTACGATAAAGTTGGAGAGAACGATACAAGGGAGTTCCGCG 1619
Helio.CYP9A1V2 TATTAACCTTGTGATTTTATTTTATTTAAATATATTTTATTATGAATAAAATATTGTGCATT 1753

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 -----
  CYP9L1 -----
  Cx.CYP9C1Cul -----
  CYP9B2Cul -----
Aed.CYP9J1 ATCCGTGGCAAACAAAAGTTATCCCGGATACGTAAGTCACATTGACTACAATCATGGTATG 1822
  CYP9J2 ATCCGTGGCAAACAAAAGTTATCCCGGATACGTAAGTCACATTGACTACAATCATGGTATG 1818
  CYP9H1 -----
Dros.CYP9C1Dro ACAGTCAGATACCCTTTACTTAGCTAGTGGCATTCAAAGTCGTTTTGAATAGGAATTGAC 1679
  CYP9B1Dro TATGTATACA----- 1763
Helio.CYP9A1V2 -----

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 -----
  CYP9L1 -----
  Cx.CYP9C1Cul -----
  CYP9B2Cul -----
Aed.CYP9J1 TTTAATGAACACAAAATATTTGGAAGTCATCCAAAACGCAAAGTCGATGTTACCGTACTTT 1882
  CYP9J2 TTTAATAAACACAAAATATTTGGAAGTCATCCAAAACGCAAAGTCGATGTTACCGTACTTT 1878
  CYP9H1 -----
Dros.CYP9C1Dro AGGAATTGGAGGATTCCGGTTAATAAAAAAGACGGATTAGTTGATAAGAATAAAATACACA 1739
  CYP9B1Dro -----
Helio.CYP9A1V2 -----

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 -----
  CYP9L1 -----
  Cx.CYP9C1Cul -----
  CYP9B2Cul -----
Aed.CYP9J1 GGAGTGTATC----TAATTGAGCATATTA----- 1915
  CYP9J2 GGAGTGTATCAATGTAATTGAGCATATTA----- 1915
  CYP9H1 -----
Dros.CYP9C1Dro GACATATATTTTA----- 1752
  CYP9B1Dro -----
Helio.CYP9A1V2 -----

```

Figura 33. Alineamiento completo de secuencias de mRNA de la familia CYP9 de insectos de la familia Culicidae.

Los nucleótidos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los nucleótidos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador Forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. W:A/T R: A/G Y: C/T S:C/G. Fun: A. funestus. Gamb: A. gambiae. Cx: Cx. quiquefasciatus. Aed: Ae. aegypti

```

Fun. CYP9J14 -----
    CYP9J13 -----
    CYP9J12 -----
    CYP9J11 -----
Gamb. CYP9K1 -----
    CYP9L1 -----
    Cx. CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul -----ATGATAACAGACGTGCTG----T 19
Aed. CYP9J1 ATCAGTAGTGTTACTTTTTCTCGTTCAACAATCACTTCAGTTTGCTTGGCCTACTGCGTAT 60
    CYP9J2 ATCAGTAGTGTTACTTTTTCTCGTTCAACAATCACTTCAGTTTGCTTGGCCTACTG----T 56

Fun. CYP9M3 -----
    CYP9J14 -----
    CYP9J13 -----
    CYP9J12 -----
    CYP9J11 -----
Gamb. CYP9K1 ---ATGTTGGGTACGCTTGCCTCGCTGCTCTTTTTCGCTCGAGGGTGTCTGCTGGTGGCC 57
    CYP9L1 -----ATGGAGATAAACTTAATGTACGTTATTGGAATCGTA 36
    Cx. CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul GTGCGATTT-----GCAGCTGGATTGTGTCATCCAATTTGGTGGTACTGATTTGTTT 71
Aed. CYP9J1 GTGGGACTTCTCTAAGAACATGGTCGAAGTAAACATATTCTGCTTTGGCTGTGGGC 120
    CYP9J2 GTGGGACTTCTCTAAGAACATGGTCGAAGTAAACCTATTCTGCTTTGGCTGTGGGC 116

Fun. CYP9M3 -----
    CYP9J14 -----
    CYP9J13 -----
    CYP9J12 -----
    CYP9J11 -----
Gamb. CYP9K1 CTGCTAGCCCTGCTCTACTACTATGTGGTGGTGGGAGCACGCGATTCTTTGCCGACCGG 117
    CYP9L1 TCGGTGCTGGTGGCACTATACGTTTACCTAACGCACAACAACGATTTCTTCAAGAAATAC 96
    Cx. CYP9C1Cul -----
    CYP9B2Cul G--GCTCTAGTGCTAGCATATCGTTTCGGATCCATAATCATGATTTCTTACAAAGCAAA 129
Aed. CYP9J1 GCCGTAATCCTGCTGCTGTATCATTACATAGCGAAAAAGTATCACTATTTCTTACAAAA 180
    CYP9J2 GCCGTAATCCTGCTGCTGTATCATTACATAGCGAAAAAGTATCACTATTTCTTACAAAA 176

```

```

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GGCCTACCGTACCTCCCGCCAGTACCCTGCTCGGCAATGGGGCCGACTTCA-TAACCGG 176
CYP9L1 CCCATACCCTGCCTGCCAGTGGAAACCACCTTTTCGGTAGCACT-CGCCAGTTTTTGTCTGAA 155
Cx.CYP9C1Cul -----
CYP9B2Cul GGAATACC-TGGTCCGAGACCACCTTCCGTTTGTGGGAAAACAGTGGCAGTGGCTGCTGGG 188
Aed.CYP9J1 CCGATACCATGCATCAAACCCACCTTCTGCTGGGCATCTTCGATATGGTTG-TGTTGAA 239
CYP9J2 CCGATACCATGCATCAAACCCACCTTCTGCTGGGCATCTTCGATATGGTTG-TGTTGAA 235

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 CAAGCGGCTGCTAACCGATGTGCTGAGCGATATGTATCACCGTTTTCCGCGCCATCGGGTT 236
CYP9L1 AAAAATTTTCATTCAGCGAATTTGTTTCGCTCAAACCTACGAACGATTCCCGAATGCAAAAAAT 215
Cx.CYP9C1Cul -----
CYP9B2Cul AAAAGTATCGTTCTTTGATGTATTTCAAGAGTTGTACCAGTCTTCAAGAACACAAAAT 248
Aed.CYP9J1 ACGGGTTGAACTGGTTTTCCGATCAAACCTTCTGTACAACCTCCTATCCAGATGCGAAAAAT 299
CYP9J2 ACGGGTTGAACTGGTTTTCCGATCAAACCTTCTGTACAACCTCCTATCCAGACGCGAAAAAT 295

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 CTTCGGCTACTTCGACTTCTTTTCGCGATCTACGTGGTGGCGATCTGGAGCTGGTGAA 296
CYP9L1 GTACGGTATGTTTCGAGATGTTTACGCGGATGTTTGTTCATTCGCGATCCGGAGCTGATCAA 275
Cx.CYP9C1Cul -----
CYP9B2Cul GTTCGGGCTGTTTGACTTTCATGGGGCCAGTCTATGTGTGGGAGATTTTGAATTTGGTGAA 308
CYP9J1 CATCGGCTACTACGAGCTGACGAAGCCAACTACATGGTGGCTGACCCAGAGATGATCAA 359
Aed.CYP9J2 CATCGGCTACTACGAACTGACGAAGCCAACTACATGGTGGCTGACCCAGAGATGATCAA 355

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GCAGATCTGCATCAAGGATTTTCGACCACTTCGTCAACCACCGCATTACGCTGGACGAAAA 356
CYP9L1 GCAGATCAGCGTGAAAGATTTTCGATCACTTTATCAACCATCGACCATTAATGAAGGCAGA 335
Cx.CYP9C1Cul -----
CYP9B2Cul ACAGGTTTGCATCAAGGACTTTGACAGCTTTACTGATAGACGGTTTCAGTTCAACGAGGA 368
Aed.CYP9J1 GAAGATCGCCATCAAGGACTTCGACAGCTTCACCGATCGAACACCGGTATTTGGCGATGC 419
CYP9J2 GAAGATCGCCATCAAGGACTTCGACAGCTTCACCGATCGAACACCGGTATTTGGCGATGC 415

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 CCATGACCCGCTG-----TTCGGGCGGGCCCTGTTTGGGATGCGCGACACGGG 404
CYP9L1 CAACTCTTCCAACCTACTGCAATGTTCTCGAAAAATACTTTTCAACTTTACTGGTCAACG 395
Cx.CYP9C1Cul -----
CYP9B2Cul G--TCGGATCCAC-----TGTTTTCTAACGCTTTGTTTGAATTAAGGGACACG 416
Aed.CYP9J1 GGTTCGCCGACAGTT-----TGTTCTTCAATTCGTTGTTCTCGCTCCGTGGACAGAA 473
CYP9J2 GGTTCGCCGACAGTT-----TGTTCTTCAACTCGTTGTTCTCGCTCCGTGGACAGAA 469

Fun.CYP9M3 -----
CYP9J14 -----
CYP9J13 -----
CYP9J12 -----
CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 CTGGCGAACATGCGCACTATCCTTAGCCCGGCCTTTACCAGGCAAGATGCGGCTA-A 463
CYP9L1 GTGGCGTAACGTAAGGACCACTTAGTCCCACCTTACCAGGCAAGATGCGGCTA-A 454
Cx.CYP9C1Cul -----
CYP9B2Cul ATGGCGAATATGAGAGCGATCCTTAGTCCGGCTTTTACCAGGCAAGATGAGAGGA-A 475
Aed.CYP9J1 GTGGCGGATATGCGGTCAACTCTGAGTCTGCTTTCACCGGAACTCGTATGCGGCTA-A 532
CYP9J2 GTGGCGGATATGCGGTCAACTCTGAGTCTGCTTTCACCGGAACTCGTATGCGGCTA-A 528

```

F

5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'

```

Fun.CYP9M3      TGTITGGCCTGCTGAGCAAAAAGCGGGCGATGCGATGGATCGTCTGGTGTATTTAGCC 85
CYP9J14        TGTITCAGCAGTGGTGGAAATGCGAGCAGCGGCATGGTGCAGTATTATAAAAAACAGACC 76
CYP9J13        TGTITGAACTGATGAGCGAAAAGCTGCCAGGGCATGGTGCAGCATCTGCTGGAAGAAGCGC 64
CYP9J12        TGTITGCGCTGATGCGGAATGCGGCCAGACCATGGTGGCGCATTTTCGTAGCGAAGAAC 85
CYP9J11        TGTITGAACTGATGCGGAATGCGAGCGCGAACATGGCGAAACATTATCTGTAAGAAATTC 85
Gamb.CYP9K1    TGTTCCGGGCTGATCAGGAGCTACTGTGACGGGGCGGTGCGGACGATCCGGTCGGAGCTGG 523
CYP9L1        TGTTCCGCATGATCTTGGAGTGCAGCGACAACATGGTACAGGGCCCTT----GCACACCC 509
Cx.CYP9C1Cul  CGCTTCTGCTGTACTGTTGTACCCTGGAGCATGCCACCTACGATTACTTCCGAACGGC 97
CYP9B2Cul     TGTTCCAGTTTATCACTGATTATTGTCAAAAAGCGAATGACACCGTTAAA--GAGATCGT 533
Aed.CYP9J1     TGGCCGAGTTGGTGGTCAAATGTGCCACCAGTATGACGGACTTTTCCATTCCGGAACGGA 592
CYP9J2        TGGCCGAGTTGGTGGTCAAATGTGCCACCAGTATGACGGACTTTTATTCATTCCGGAACGGA 588
*

Fun.CYP9M3      GTG-----ATAAAAGCTTTACCATG---GAACTGCGTGATCTGTATAGCCGCTGGGCA 136
CYP9J14        ATACCAACGGCCAGTGC-----TATGAACTGAAAAGAGTGTITTAGCCGTTATACCA 127
CYP9J13        GTGCG--GATGAAAGCAAAACAGGTGCATGAAATGAAAGATATTTTACCCGCTCGGCCGA 121
CYP9J12        AGAAAGCGGGCGGCCACCGCGGTGCAGCTGGAATGAAAGATGTGATGACCCGTTTTCGCA 145
CYP9J11        GTATGAAAGCGGCTGAGCAGCCGTGAACATGAAATGAAAGATGTGTTTACCCGTTATGCGA 145
Gamb.CYP9K1    GCGCG--GACGGAACCG--CCGAGCTCGAGATGAAAGAGCTGTTCGCGCGTTCGCCGA 577
CYP9L1        AACCG--GGCGTGAATG-----TGAAGTGAAGATCTGTTTCATCCGCTTCACAA 556
Cx.CYP9C1Cul  GCGCG--GTTCCGTTCCCAAACCGGTCACCTCTTCGGCAACCTGTGGCCATCCGG 154
CYP9B2Cul     AGGTT--CAACTGGAGCCAAA--GAACTCGATATTCGTGATATTTTCAACAAATACTCCA 589
Aed.CYP9J1     AAGC--CGGCAGAAGACTG--GAATCAACATGAAAGACACTTTTTCCGCGATTTGTCT 646
CYP9J2        AGGC--CGGCAGAAGACTG--GAATCAACATGAAAGACACTTTTTCCGCGATTTGTCT 642
*

Fun.CYP9M3      ACGATGTGATGAGCAGCATTAGCTTTGGCGTGGAAAGTGGATAGCCTGACCGATCGTGA 196
CYP9J14        CCGATGTGATTGCGAGCTGCGGCTTTGGCCTGAAAGTGGATAGCTTTTCGTGATAGCACA 187
CYP9J13        ACGATGTGATTGCGAGCATTGCGGTTTGGCATTGAGTGAACAGCTTTAGCGAAGCTGAAA 181
CYP9J12        ACGATGTGATTGCGACCGCGGCTTTGGCATTAAAGTGGATAGCTTTTCGTGATCCGCGA 205
CYP9J11        ACGATGTGATTGCGACCTGCGGCTTTGGCATTAAAGTGGATAGCCTGAAAACCGCGATA 205
Gamb.CYP9K1    ACGACATAGTGGCGACCTGCGGCTTTGGCATTGAGATCAACTCGTTCGCGACCGGGCGA 637
CYP9L1        ACGATGTGATAGCATCTCTGTGCGTTTGGTGTGACGTCACCTCGTTCGAGACAAAAGATA 616
Cx.CYP9C1Cul  CCGCAAAAACCACCGGCTTGAATCCGCTC--GGCCGGCTACTGGCAGTTTCCGGAGG 211
CYP9B2Cul     ACGACATAATTGCAAGCTGTGCGTTTGGTGGGAAATGAACTCGCTTAGGGATGGCGAAA 649
Aed.CYP9J1     GTGACCGGATCGCAAGCGTGGCATTGGAATCGAGGTTGACTCGTTCGCGGATCCGGA 706
CYP9J2        GTGACCGGATCGCAAGCGTGGCATTGGAATCGAGGTTGACTCGTTCGCGGATCCGGA 702
*

Fun.CYP9M3      ACGAATTTTTTCTGAAAAGGCAACGCTGCGCGCAGATTGATGGCCT--GCCGG--GCCTG 252
CYP9J14        ACGGCTTTTTATACAGCGGCCAGCGTATGATTGATTTTGGCGGTTTTAAAGTGC--TGCTG 240
CYP9J13        ACGATTTTTATAAACGTGGCAAAANNCTGCTGGATTTTACCAGCTTTTGGCCGA--GCATT 246
CYP9J12        ACCAGTTTATTAGCATGGCGGCTAGCGTGCAGCCAGGAAAAGCNMNGTGAAG--TGCTG 264
CYP9J11        ACGATTTTTATGTGAACGGCAAAAATGATGGCCTTTAACCTCCGATTGTGA--TGCTG 264
Gamb.CYP9K1    ACGGCTTCTTCAACTCGGCAAGGAGCTGACCAACCTGGATGGCGTC--CAGG--GGCTG 693
CYP9L1        ATGATTTCTTTCGCTATGGCAAAAGATTGTCCAACTTCACTGCACTTAAAGTGGG--CGCTC 675
Cx.CYP9C1Cul  CTCGCTTTTCCGGCTTCTTCAAC--TTTCGCGGGCGGGCTACCTGGTGCACA--TCTG 267
CYP9B2Cul     ACGAGTTTTTACCAGGCTAA--ACATATGACACATTTGAATACATGGCAATGGGTA 705
Aed.CYP9J1     ATGAGTCTTTACAAAAGGGCAATGAGTACAGAAAATACATACTTTCAAATCGTTGGCGA 766
CYP9J2        ATGAGTTTTTACAAGAGGGCAATGAGACACAGAAAATACATACTTTCAAATCGTTGGCGA 762
*

Fun.CYP9M3      AAAATTTCTGATGGCGACCACCATTCCGAAAAGTGTTCGTTTTTCTGCGT--CTGAGCGGC- 309
CYP9J14        AAAAGTCTGGCGTATCGTCTGTTTCCGTTGGATTATGGA AAAACTGGAA--GTGGATCTG-- 303
CYP9J13        CGTTTTATGCTGTTTATGNMNTGCGCGTGTGATGCTGAAAAGTGAAC--ATTGAACTG-- 297
CYP9J12        AAAATGCTGGGCTTTACCTTTTGGCCGAAAAGTATGNMNTGCTGAAAC--ATTGATTTT-- 321
CYP9J11        AAACTGATTGGCTTTTCTGTGTGTCGAAAAGTATGAACTGGMNMMN--CTGGATCTG-- 321
Gamb.CYP9K1    AAGTTCCTGGGCTTTTCTGCTTTTCCGCGGCTGATGGCTGCGCTTCGA--TTGCGTCTG-- 750
CYP9L1        AAGTCAATGGGATATCAAGTGTTCCTCAAGCTAATGGCACAACATACAG--ATGGACATA-- 732
Cx.CYP9C1Cul  GACCTGCTGAAGCGCATTACGATCAAGGACTTTGACCATTTTTGTGGACCACTCGTTTAA 327
CYP9B2Cul     AAGTTTTATGATGTTCAAGTTCGTTTCCGCGACTAGCAAAAATCCTACGA--ATTGCACTG- 763
Aed.CYP9J1     CATTCTTACTTTTACGGTTCTGCCAAT--TTTGC AAAAGTATTCAA--TTTGCATTTCT- 822
CYP9J2        CATTCTTACTTTTACGGTTTGTCCCAAT--TTTGC AAAAGTATTCAA--TTTGCATTTCT- 818
*

Fun.CYP9M3      ATGTATAAAGATGTGAACGAATTTTATCTGGATGCGGTGAGCCGTAACATTAACCTGCGT 369
CYP9J14        TTTGATCGTGAACGAACAGCTTTTTTGGCGAAATTTGCTGGAAAACCGAAAAACCCGCT 363
CYP9J13        ATGGATAAAGAAATGTGCCAGCATTTTTCATGCGGATGATTATGGATAACATGAAAGTGGCT 357
CYP9J12        CTGACCCCGGAAGAAAACCGTTTTTTTTNNMNTATACCATTTCTGGAAAACCATGGCTACCCG 381
CYP9J11        TTTGATCGTGAACAGGGCGATTATTTTACCAGAAATTTATTCGTGATACCCCTGAAAACCCG 381
Gamb.CYP9K1    TTTAGCGCAAGATGACCAGCTTCTTCCGACACGTTGGTGTGATGATGATAACAATCAGCAGCG 810
CYP9L1        TTCGATAGCACACAGTACAGTTCTTCCAGAAAAGTTTTAGGCACTGTTGTTCAAGAGCGA 792
Cx.CYP9C1Cul  GTGTCACCGGAGTGGACCCGTTTCACTGGCTGTTTCCGCTGTTCTTTTCCGAGGGACTTCGC 387
CYP9B2Cul     TTG-ACCAAATGACTACGGATTTCATGAGAGAAGCAGTTCTGATTCGTAATTGCAACAGCGT 822
Aed.CYP9J1     GTGGACCGGAATGTGGCAGGTTACTTCAAAAAGTTGATTTTGGATAATATGGACACCGCG 882
CYP9J2        GTGGACCGGAATGTGGCAGGTTACTTCAAAAAGTTGATTTTCCGATAATATGGACACCGCG 878
*

```

Fun. CYP9M3	AGATATTGATATTGCGGGCGCGACCCGCGAGCTTTTTTTTTGGCGG-CATTGAAACCACCA	595
CYP9J14	CCAGATGGA-ACTGGTGGCGCAGTGCCTGATTTTTTTCTGGCGGGCTTTGATACCGTGG	589
CYP9J13	CGAAAAAGA-ACTGGTGGCGCAGTGCCTTCTGTTTTTTCTGGCGGGCTTTMNNACCATTA	577
CYP9J12	CGATNMNGA-ACTGATTGCGCAGGCGTTTATTTTTTTTTTGGCGGGCTTTGAAACCATTA	613
CYP9J11	CGAACTGGA-AATGGTGGCGCAGTGCCTGATTTTTTTCTGGCGGGCTTTGATACCGTGA	607
Gamb. CYP9K1	CGACGACGA-CCTAACCGCCAGTGCACCGTGTTTTTCTTCGGCGGGTACGATACCGTGT	1003
CYP9L1	CGAGAATGA-AATGATAGCACAGTGTCTGCTGTTCTTCTTCTGCTGGCTTCGACACAATCG	1015
Cx. CYP9C1Cul	TGGCAACGA-CGTGATGACCTCGATCTCGTTCGGCATCGATACTGAC-TCAGTGCAGAT	600
CYP9B2Cul	CCACGACGA-CITCGTATCACAATGTGCCGTAATTTGATTGTTGGTGGCCTTGACACCGTGA	1018
Aed. CYP9J1	GGACAACGA-GCTGATATCGCAGTGTTCCTCTTTTTCTTTGCGCCATTTCGATAACGTAT	1099
CYP9J2	GGACAACGA-GCTGATATCGCAGTGTTCCTCTTTTTCTTTGCGCCATTTCGATAACGTAT	1095
	* * * * *	
Fun. CYP9M3	CCACCCTGCTGTGCTTTGCGAGCTATGAACTGAGCATTAAACCCGAGCATTTCAGGATCGTC	655
CYP9J14	CGAACTGCCTGACCTTTCTGGCGTATGAACTGACCTGAACCGTGATATTCAGGATCGTC	649
CYP9J13	GCACCGCGCTGGGCTTTCTGGCGTATGAACTGATGCTGCATCCGGAACTTCAGGATCGTC	637
CYP9J12	GCTGGACCCTGAGCTTTGCGCTGTATGAACTGGCGGTGAACGATGATATTCAGMNNCGTC	673
CYP9J11	GCACCTGCCTGACCTTTCTGGCGTATGAACTGACCGTGAACAAAGATGCGCAGAACAAAC	667
Gamb. CYP9K1	CCACGTTGTCTGCATTTATGGCGCACGAACTCGCCGTCAACCCGGACGTCACAGAGCGGC	1063
CYP9L1	CAACATCGATGACATTTGTACTGTACGAAAGTGACGCTAGCACCGGAAATCCAGCAGCGTC	1075
Cx. CYP9C1Cul	CCGGACAACGAGTTCTTCGGGA--ATGGCCTT-CGATTGTCCGTTACAGCCGGCATCCAA	657
CYP9B2Cul	CAAAATATTGCCTTTTCATGGCCCATGAATTGGCCATTAATCAGCACGTCACAGGTCAAAT	1078
Aed. CYP9J1	CCAGCATCCTGACTTTCTGTCTTATGAGCTTACCGTCAATCAGGATATTCACAGCAGTC	1159
CYP9J2	CCAGCATCCTGGCTTTCTGTCTTATGAGCTTACCGTCAATCAGGATATTCACAGCAGTC	1155
	* * * * *	
Fun. CYP9M3	TGCGTGCGGAAATGATGAAACCCGTGAAGAAGTGAAGATGGCAAAACCC--GACCTA	713
CYP9J14	TGTATGAAGAAATTTGTGGCGACCGATATTGATCTGC--AGCAGAAACCGC-T--GACCTA	704
CYP9J13	TGTATGAAGAAATTTGTGGCGTGGATGAAAACTG--AACCGCAACCCGCT--GAACTA	692
CYP9J12	TGTTTGAAGAAAGTGCATGAAAGCGAACAGAGCCTGGAAAGAAAGCAAAAGCCT--GAGCTA	731
CYP9J11	TGTATGAAGAAATTCGTGCGACCGCAAAAGCCTG---GGCGGCAGCAGCCT--GACCTA	722
Gamb. CYP9K1	TGCGGGACGAGATCGACCGCGTGGCTCAACGATCGGCAGCGCCGACAGCT--TAACTA	1121
CYP9L1	TGTACGAGGAGATCCAAACAAGTTAGCGAGACATTG---GATGGCAAAAGCCT--CACCTA	1130
Cx. CYP9C1Cul	GGGTTAAAGTTCTTCTCTCAACCGTGATTCCGCCGAGGTGTTTCATATTTTGGGATTG	717
CYP9B2Cul	TACGCGAAGAAATCGAGTCCATATTGAACGATAGA---GATGGCAATCAGT--CACTTA	1133
CYP9J1	TCTACGAAGAAATTCAGTAACCGAGTCAACCCTC---AACGGCAACCGAT--AACCTA	1214
Aed. CYP9J2	TCTACGAAGAAATTCAGTAACCGAGTCAACCCTC---AACGGCAACCGAT--AACCTA	1210
	* * * *	

Figura 34. Alineamiento completo de secuencias de mRNA de la familia CYP9 de diferentes insectos.

Los residuos conservados utilizados para diseñar los iniciadores están marcados con cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. F: iniciador Forward. R: nuevo complemento reverse del iniciador reverse. W: A/T, R: A/G Y: C/T, S: C/G. Fun: A. funetus. Gamb: A. gambiae. Cx: Cx. quinquefasciatus. Aed: Ae. aegypti. Dros: D. melanogaster. Helio: Heliothis virescens.

Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	-----	
CYP9L1	-----	
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	-----	
Aed. CYP9J1	-----ATCAGTAGTGTTACTTTTCTCGTTCAACAATCACTTCA	38
CYP9J2	-----ATCAGTAGTGTTACTTTTCTCGTTCAACAATCACTTCA	38
CYP9H1	-----	
Dros. CYP9C1Dro	TCTGTTGACTGGCGAAGTAGCTCTCTGAATTTTTTCGGAACTCCACGGCTGCGCAGCTC	60
CYP9B1Dro	-----	
Helio CYP9A1V2	-----AGATCACGCCAGTCAGTCACAGTCACGGT	29
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	-----ATGTTGGGTACGCTTGCCTCGCTGCTTTTC	32
CYP9L1	-----ATGGAGATAAACTT	14
Cx. CYP9C1Cu1	-----ATGGTCGTGGCACT	14
CYP9B2Cu1	TGATAACAGACGTGCTG---TGTGCGATT-----GCAGCTGGATTGTGTCATCCA	49
Aed. CYP9J1	GTTTGTCTGGCCTACTGCGTATGTGGGACTTCTCTCTAAGAACATGGTCGAAAGTAAACAT	98
CYP9J2	GTTTGTCTGGCCTACTG---TGTGGGACTTCTCTCTAAGAACATGGTCGAAAGTAAACCT	94
CYP9H1	-----ATGGATCAGTCGAT	14
Dros. CYP9C1Dro	GATTAGAGTCCCCTACTCCCTACTCCACGGCTCCATCCCAAAAATCCCG-TCATGGTTTT	119
CYP9B1Dro	-----CAGTTAGCAATAATACATCAGGTGATAATAATGTCAIT	38
Helio CYP9A1V2	CACAACAAGTGGCGCGCGCCTGTCTGTCAITTTGGTTTTCTGTTTTTCTCGCAGCCAT	89
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	GCTCGAGGGTGTCTGCTGGTGGCCCTGCTAGCCCTGCTTACTACTATGTGGTGGTGGG	92
CYP9L1	AATGTACGTTATTGGAATCGTATCGGTGCTGGTG---GCACTATACGTTTACCTAACGCA	71
Cx. CYP9C1Cu1	GCTGATCACGTTAGCCTTGCAGCGCTTCTGCTGTACTGTTGTACCGCTGGAGATCGC	74
CYP9B2Cu1	ATTTGGTGGTACTGATTTGTTG--GCTCTAGTG---CTAGCATATCGTTTCGGATCCCA	104
Aed. CYP9J1	ATTTCTGCTTTGGCTGTGGGCGCGTAATCCTG---CTGCTGTATCATTACATAGCGAA	155
CYP9J2	ATTTCTGCTTTGGCTGTGGGCGCGTAATCCTG---CTGCTGTATCATTACATAGCGAA	151
CYP9H1	GATAGCACTCGCTTTGTTTATAAATACTGCTCGTTTTGCTC---TACAAGTGGTGGTGGC	71
Dros. CYP9C1Dro	CGTGGAGTTGTCGATTTCTGAGCCTTACATCGGTTTGTATTGTACAAAATGGTCCGCTA	179
CYP9B1Dro	TGTGGAAATATGTTCTGCTCTGGCTACCATCGGCTTACTATTGTTCAAAGTGAAGTACTGG	98
Helio CYP9A1V2	GATCTGCTTCTAACATGCTGGTGGTGGTATCATCACAGCGGCTCTGCTGTACTTCCGAAG	149
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	GAGCACGCGATTCTTTGCCGACCGGGCGGTACCCTACCTCCCGCCAGTACCCTGCTCGG	152
CYP9L1	CAACAACGATTTCTTCAAGAAATACCCATACCTCGCTGCCAGTGAACCACTTTTCGG	131
Cx. CYP9C1Cu1	CACCTACGATTACTTCAAGCGGCGCGGTTCCGTTCCCAAAACCGGTCCTTCTCGG	134
CYP9B2Cu1	TAATCATGATTTCTTCAAGCAAAAGGAATACC-TGGTCCGAGACCACTTCCGTTTGTGG	163
Aed. CYP9J1	AAAGTATCACTATTTCTTACAAAACCGATACCATGCATCAAACCCACTTCTGCTGGG	215
CYP9J2	AAAGTATCACTATTTCTTACAAAACCGATACCATGCATCAAACCCACTTCTGCTGGG	211
CYP9H1	CAAAATATGATGTGTTCAAGTGAAGGGGTGTGTACATGAGAAGCCATGGCCCTCAATTTGG	131
Dros. CYP9C1Dro	CACCTTCGGGATTTCTTCAAGAGGGCGGTGGCCACGAAAAGCCAAATCTCTGCTAGG	239
CYP9B1Dro	CACCTTTAAGGCTTTTCAAGGGCGAAACCTATCTTTCGAGAAAACCGTACCCATTTTGG	158
Helio CYP9A1V2	CGTGTACGCCAACTGTCCAAGCAGGGGTGAACCACTCCCAAAATCCAGTCTTCGG	209

```

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 ACGTGGTGC CGGATCTGGAGCTGGTGAAGCAGATCTGCATCAAGGATTTCCGACCCTTCG 328
  CYP9L1 TTGTCATTCCGGATCCGGAGCTGATCAAGCAGATCACGGTGAAAAGATTTTCGATCACTTTA 307
  Cx.CYP9C1Cul ACCTGGTGCACGATCTGGACCTGCTGAAAGCGCATTACGATCAAGGACTTTGACCATTTTG 310
  CYP9B2Cul ATGTGTTGCGGAGATTTTGATTTGGTGAAACAGGTTTGATCAAGGACTTTGACAGCTTTA 340
  Aed.CYP9J1 ACATGGTGC GTGACCCAGAGATGATCAAGAAGATCGCCATCAAGGACTTCGACAGCTTCA 391
  CYP9J2 ACATGGTGC GTGACCCAGAGATGATCAAGAAGATCGCCATCAAGGACTTCGACAGCTTCA 387
  CYP9H1 TCTTTGTCCGAGACCCCTGAGCTCATCAAGCTCATCGGCATCAAGGAATTCGACCCTTCG 310
Dros.CYP9C1Dro ACTATCTCTCCGACCCGGAACCTATTGCGCCAGGTGGGCATCAAGAACTTCGATACCTTCA 418
  CYP9B1Dro TCCAGATAAACGACCCCCAGCTGATTAAGAAAGATATGCGTTAAGGACTTTGACCCTTTC 334
Helio.CYP9A1V2 TGGTAGTTCTCGACGTGGACACTGTCAAGAGGATCACCGTCAAAGACTTTGACATTTTCG 385

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 TCAACCACCGCATTACGCTGGACGAAAACCATGACCCGC-----TGTTCCGGGC 376
  CYP9L1 TCAACCATCGACCATTAATGAAGGCAGACAACTCTTCCAACCTCTACTGCAATGTTCTCGA 367
  Cx.CYP9C1Cul TGGACCCTCGTTTAACTGTGTCACCCGGAGG--TGGACCCGT-----TCATCCGCT 358
  CYP9B2Cul CTGATAGACGGTTTTCAGTTCAACGAGGAG--TCGGATCCAC-----TGTTTCTA 388
  Aed.CYP9J1 CCGATCGAACACCGGTATTTGGCGATGCGGTTCCCGCCGACAGTT-----TGTTCTTCA 445
  CYP9J2 CCGATCGAACACCGGTATTTGGCGATGCGGTTCCCGCCGACAGTT-----TGTTCTTCA 441
  CYP9H1 TTAACCACAATAG-----CATGCACAACAATA---TACAGGAGTCGA--TACTCTCGA 358
Dros.CYP9C1Dro CCAACCATCGCAAAGGGATAAAGTGAAGGATTTCAACGATACCAGCGTGA---TTTCCAAGA 475
  CYP9B1Dro CCAACCACCGAC-----ACTGAATATCCCTA---ACGAGCGTC---TAGTTAACG 379
Helio.CYP9A1V2 TTGACAGGCGAAGCT---TCACCAGCAGCTTTGATCCCA-----TCTTTGGAA 430

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 CAATGGGGCCGACTTCA---TAACGGCGAAGCGGCTGCTAACCGATGTGCTGAGCGGATAT 209
  CYP9L1 TAG-CAGTCGCCAGTTTT--TGCTGAAAAAATTTCAATTCAGCGAATTTGTTGCTCAAA 188
  Cx.CYP9C1Cul AAACCTGTGGCCATTCTCT--GGCCGGCAAAACCACCGCGGTTGAATCCGCCCTCGGCCGGC 192
  CYP9B2Cul GAAACACGTGGCAGTGGC--TGCTGGGAAAAAGTATCGTTCTTTGATGATATTTCAAGAGTT 221
  Aed.CYP9J1 CATCTTCGATATGGTTG---TGTTGAAAACGGGTTGAACTGGTTTTTCGGATCAAAAATTCT 272
  CYP9J2 CATCTTCGATATGGTTG---TGTTGAAAACGGGTTGAACTGGTTTTTCGGATCAAAAATTCT 268
  CYP9H1 CAATATTCCGCTGAAAGCCATGATCGGTGGAATGCCAGTACTAAAGAAAATGATCGAATT 191
Dros.CYP9C1Dro AAATATTCCGTTGGTGGTGTGATGGGTAAAGAGTCGTACATAAAACATAGCATTGACCT 299
  CYP9B1Dro TAACATGGCTGCATCGCCCTTGCAA---AAAGCCTCATTTCAAAAACAAATCTCCGAGTT 215
Helio.CYP9A1V2 GAACCTGATGTGGATGG---TCATGAAGCAGGAGCACTTCGTTGATACCTCGGGCGGGTG 266

Fun.CYP9M3 -----
  CYP9J14 -----
  CYP9J13 -----
  CYP9J12 -----
  CYP9J11 -----
Gamb.CYP9K1 GTATCACCG-TTTCGCCAGCCATCGGTTCTTCGGCTACTTCGACTTCCTTTTCGCCGATCT 268
  CYP9L1 CTACGAACG-ATTCCGAATGCAAAAATGTACGGTATGTTTCGAGATGTTTACGCCGATGT 247
  Cx.CYP9C1Cul -TACTGGCA-GTTTTCCGGAGGCTCGCTTTTTCCGGCTTCTTCAAATTTCCGCCGGCCGGCT 250
  CYP9B2Cul GTACCAGTC-GTTCAAAGAACACAAACTGTTCCGGCTGTTTGACTTCATGGGGCCAGTCT 280
  Aed.CYP9J1 GTACAACCTC-CTATCCAGATGCCAAAATCATCGGCTACTACGAGCTGACGAAGCCAACCT 331
  CYP9J2 GTACAACCTC-CTATCCAGACGCGAAAATCATCGGCTACTACGAACTGACGAAGCCAACCT 327
  CYP9H1 GCATACGAAACACACGGGATCCCCGG-TATATGGTATCTACGCCCTTCGAGATGCCGTCT 250
Dros.CYP9C1Dro GCACTTCGC-CCTGAAGCAGCACAAGGCTTATGGAGTCTTCAAACCTCGGGATCCCTTAT 358
  CYP9B1Dro CTATAATCG-CACTCGACATCACAACCTGGTAGGGCTCTTTAATCTACGCACCCCAATGA 274
Helio.CYP9A1V2 TGTCAAAGC-TTTTCTGATGATAAGATAGTAGGACACTACGACATGGTGAGCCCTATCT 325

```

Fun.CYP9M3 GGGCGATGCGATGGATCGTCTG-GTGATGTTTAGCCGT--G-----ATAAAAGCTTTAC 101
 CYP9J14 CAGCGGCATGGTGCAGTATTAT-AAAAACAGACCGAT--ACC---AACGG--CCAGTGC 93
 CYP9J13 CCAGGGCATGGTGCAGCATCTG-CTGGAAGAACGCGGT--GCG---GATGAAAACAAACA 83
 CYP9J12 CCAGACCATGGTGGCGCATTTTCGTAGCGAAGAACAGAAAAGCG---GGCGGCACCGGCGT 107
 CYP9J11 CGCGAACATGGCGAAAACATTATCGTGAAGAAAATTCGTATGAAC---GGCGTGAGCAGCCG 107
 Gamb.CYP9K1 TGACGGGGCGGTGCGGACGATC--CGGTCCGAGCTGGG-CGCG---GACGGAACC---GC 539
 CYP9L1 CGACAACATGGTACAGGCCCTT-----GCACACC---CAACCGGG---CGT 519
 Cx.CYP9C1Cul CGAGGGAGCGATGCAGAG-----GTTGGCT---CAAGGGGGGAAGGT 509
 CYP9B2Cul TCAAAAAGCGAATGACACCGTT---AAA--GAGATCGTAGGTT---CAACTGGAGCCAAA 552
 Aed.CYP9J1 CACCAGTATGACGGACTTTTTTC---CATTGGAAGCGAAAAGC---CGGCAGAAGACTG- 609
 CYP9J2 CACCAGTATGACGGACTTTTATT---CATTGGAAGCGAAAAGC---CGGCAGAAGACTG- 605
 CYP9H1 CG--AGGAGGGCGTTATCCACATACAGGAG-CAGTTGGAGCTGTCCGAGGACCGGAGCAT 527
 Dros.CYP9C1Dro TG--TAGAGGGCGGTGGACTTCGTGCAGCGC-CAACTG--GATG---CCTGGCAC---TTC 632
 CYP9B1Dro TGCCTGGAGCACCTGAAATCCTCCAGCCTATTGCTGCAGGTG---AAAATGC---CTT 551
 Helio.CYP9A1V2 TTTGAAAATGATTAGAGTACTCCGGGGGAAGATCAAGGATTCT---GGGAAACCTTACAT 599

Fun.CYP9M3 CATG---GAACTGCGTG-ATCTGTATAGCCGTCTGGGCAACGATGTGATGAGCAGCATT 157
 CYP9J14 TATG----AACTGAAAAG-AAGTGTTTAGCCGTTATACCACCGATGTGATTGCGAGCTGCG 148
 CYP9J13 GGTGCATGAAATGAAAAG-ATATTTTTACCCTGTGGCGAACGATGTGATTGCGAGCATTG 142
 CYP9J12 GCAGCTGGAAATGAAAAG-ATGTGATGACCCGTTTTGCGAACGATGTGATTGCGACCCGCG 166
 CYP9J11 TGAACATGAAATGAAAAG-ATGTGTTTACCCTGTATGCGAACGATGTGATTGCGACCTGCG 166
 Gamb.CYP9K1 CGAGCTCGAGATGAAAG-AGCTGTTCCGCGGTTCCGGCAACGACATAGTGGCGACCTGCG 598
 CYP9L1 -GAATGTGAAGTAAAAG-ATCTGTTTATCCGCTTCAAAAACGATGTGATGACATCCTGTG 577
 Cx.CYP9C1Cul CGAACGGGAGCGGAAAG-ATCTGTTTCAACGACTTGGCAACGAGTGTGATGACCTGCATC 568
 CYP9B2Cul -GAAATCGATATTCTGTG-ATATTTTTCAACAAACTCCTCAACGACATAAATGCAAGCTGTG 610
 Aed.CYP9J1 -GAATCAACATGAAAAG-ACACTTTTTTCGCGATTTGTCTGTGACCGGATCGCAAGCGTGG 667
 CYP9J2 -GAATCAACATGAAAAG-ACACTTTTTTCGCGATTTGTCTGTGACCGGATCGCAAGCGTGG 663
 CYP9H1 CGAACTGGAATGAAAG-ATTACTTCACGCGATTGCGCAACGATGTGATTGCTACGGTGG 586
 Dros.CYP9C1Dro CGAACTGGAGCTAAAAG-ACTTCTTCACGCGCTACACCAACGAGCTGATGCTGACCCGCTG 691
 CYP9B1Dro TGAGCTGGACATGAAAGTCTTTGCAACAAGCTTT-CCAACGAGCTGATTGCAACAACAG 610
 Helio.CYP9A1V2 CGACGTGGAAGCCAAAGA-GTGTGATGACCATGTACGCGAATGACGTACATGCTCATGCG 658

* * * * *

Fun.CYP9J14 -----
 CYP9J13 -----
 CYP9J12 -----
 CYP9J11 -----
 Gamb.CYP9K1 GGGCCCTGTTTGGGATGCGCGACACGCGCTGGCGCAACATGCGCACTATCCTTAGCCCGG 436
 CYP9L1 AAATACTTTTTCAATCTTACTGGTCAACCGTGGCGCTAACGTTGAGGACCACTTAGTCCCA 427
 Cx.CYP9C1Cul GTTCGCTGTTCTTTCCGAGGGACTTCGCTGGCGGATGGCCGGGCGGGCTTAGTCCCG 418
 CYP9B2Cul ACGCTTTGTTTCAATTAAGGGGACACGATGGCGGAATATGAGAGCGATCCTTAGTCCCG 448
 Aed.CYP9J1 ATTCTGTTGTTCTCGCTCCGTGGACAGAAAGTGGCGGATATGCGGTCAACTCTGAGTCTG 505
 CYP9J2 ACTCGTTGTTCTCGCTCCGTGGACAGAAAGTGGCGGATATGCGGTCAACTCTGAGTCTG 501
 CYP9H1 AAAGTCTCAATTTCCGTGCGGATGGTTCGATGGAAGGAGATGCGCAATATCCTGACACCCG 418
 Dros.CYP9C1Dro GCTTGCTCAGTCTGC---GGGATGTCGCTGGAAGCAAATGCGCAGCACCTGACGCCTA 532
 CYP9B1Dro ACATGCTCAATGTGATGAGGGATCAGCAGCTGGAGGAACATGAGGAGCTCCTGACCCCGG 439
 Helio.CYP9A1V2 GAGGGCTGCTGTTGCTACATGGTGACGAATGAAAAGCAATGCGGTCTACGATGAGTCCAG 490

F 5'-TTYACCGGCAGCAARATGCG-3'

Fun.CYP9M3 --TTTACCGGCAGCAAAATGCGTAGC-ATGTTTGGCCTGCTGAG-----CAAAGCGC 50
 CYP9J14 -----GCCAAATGCGTGACCATGTTTCAGCAGGTGGT-----GGAATGCAG 41
 CYP9J13 -----CAG--ATGTTTGAACCTGATGAG-----CGAAAGCTG 29
 CYP9J12 --TTTACCGGCAGCAAAATGCGTCTG-ATGTTTGGCCTGATTGC-----GGAATGCGG 50
 CYP9J11 --TTTACCGGCAGCAAAATGCGTCAG-ATGTTTGAACCTGATTGT-----GGAATGCAG 50
 Gamb.CYP9K1 CCTTTACCGGCAGCAAGATGCGGCTA-ATGTTTGGGCTGATCAC-----GAGTACTG 488
 CYP9L1 CGTTTACCGGCAGCAAGATGCGCCAG-ATGTTTCCCATGATCTT-----GGAGTGCAG 479
 Cx.CYP9C1Cul CGTTTACCGGCAGCAAGATGCGGAAC-ATGTTTGGAGCTGTTGGC-----GACGTACAG 470
 CYP9B2Cul CTTTTACGGGTAGCAAAATGAGAGGA-ATGTTCCAGTTTATCAC-----TGATTATTG 500
 Aed.CYP9J1 CTTTACCGGAAAGTCTGATGCGGCAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----CAAATGTGC 557
 CYP9J2 CTTTACCGGAAAGTCTGATGCGGTAC-ATGGCCGAGTTGGTGGT-----CAAATGTGC 553
 CYP9H1 CATTTACGGGAGCAAAATGCGGATA-ATGTACGACCTGATCCA-----ATCGTGCAG 470
 Dros.CYP9C1Dro CTTTACCGAGCCTCAAATCCGACAG-ATGTTTGGAGCTCATCCA-----TTTCTGCAA 584
 CYP9B1Dro TCTTACCGTCCGCCAAGATGCGGAAC-ATGTTTACCCTGATGAACGAGAGCTTCCGCTCAA 498
 Helio.CYP9A1V2 CGTTTACCGAGCTCAAAGATGCGGCTG-ATGGTGCCTTTCATGGA-----GGAGATCGC 542

*** *

Fun. CYP9M3	GCTTTGGCGTGGAAAGTGGATAGCCTGACCGATCGTAAAAACGAATTTTTTCTGAAAAGGCA	217
CYP9J14	CGTTTTGGCCTGAAAAGTGGATAGCTTTTCGTGATAGCACCAACGGCTTTTTATACCAGCGGCC	208
CYP9J13	CGTTTTGGCATTACAGGTGAACAGCTTTAGCGAACGTGAAAAACGATTTTTATAAACGTGGCA	202
CYP9J12	CGTTTTGGCATTAAAAGTGGATAGCTTTTCGTGATCCGACCAACCCAGTTTTATTAGCATGGCGC	226
CYP9J11	CGTTTTGGCATTAAAAGTGGATAGCCTGAAAAACCGGGATAACCGATTTTTATGTGAACGGCA	226
Gamb. CYP9K1	CGTTTTGGCATTGAGATCAACTCGTTCGCGGACCGGGCGAACCGCTTCTTCACTCGGCCA	658
CYP9L1	CGTTTTGGTGTGCACGCTCAACTCGTTCGAGACAAAAGATAATGTATTCTTTCCGTATGGCA	637
Cx. CYP9C1Cul	CGTTCGGCATCGATACTGACTCAGTGCAAGATCCGGACAACGAGTTCTTCCGGAATGGCC	628
CYP9B2Cul	CGTTTTGGTGTGGAAAATGAACGCTCCTTAGGGATGGCGAAAAACGAGTTTTACC GCCAGGCTA	670
Aed. CYP9J1	CATTTGGAATCGAGGTTGACTCGTTCGCGGATCCGGAAAAATGAGTCTTACAAAAAGGGCA	727
CYP9J2	CATTTGGAATCGAGGTTGACTCGTTCGCGGATCCGGAAAAATGAGTTTTACAAAGAGGGCA	723
CYP9H1	CCTTCGGCATCAGCATCAACTCGTTCAGGGCGAAAAGATAACGAGTTCTTCCGATCGGCAC	646
Dros. CYP9C1Dro	CCTTTGGCATCCAAAGTGAATTCCTTCAAGGATCCCAACAACGAGTTCTTTCCATCGGGC	751
CYP9B1Dro	CCTTTGGACTAAAAGTTAACTCATTCCGATGACCCAGAGAATGAGTTCCATACGATCGGGA	670
Helio. CYP9A1V2	CCTTCGGGCTGAAATGTGAAA---CTCCCAGGCGTCGGACCACGAGTTCTATGTCAACAGCC	715
	* * * * *	
Fun. CYP9M3	AACGCTCTGGCGCAGATTGATGGCCT----GCCGGGCTGAAAATTTCTGATGGCGACCAC	272
CYP9J14	AGCGTATGATTGATTTTGGCGGTTTTTA-A-AGTGTCTGCTGAAAGTGTGGCGTATCGTCT	266
CYP9J13	AANNCTGCTGGATTTTACCAGCTTTT-G-GCCGAGCATTCTGTTTTATGCTGTTTTATGNN	260
CYP9J12	GTAGCGTGACCAGCCAGGAAAAGCANNNG-T-GAAAGTGTGAAAATGCTGGGCTTTACCTT	284
CYP9J11	AAAAAATGATGGCGTTTAAACCGTCCGA-T-TGTGATGCTGAAAATGATTGGCTTTTCGTGT	284
Gamb. CYP9K1	AGGAGCTGACCAACCTGGATGGCGT----CCAGGGGCTGAAAGTTCTGGGCTTTTCGTCT	713
CYP9L1	AAGATTTGTCCAACCTCAGTCGACTTAAG-GTGGCGCTCAAGATCATGGGATATCAAGT	695
Cx. CYP9C1Cul	TTCGATTGTCCGTTTACAGCCGGCATC----CAAGGGTTAAAAGTTCTTCTCTCAACCGT	683
CYP9B2Cul	A----ACATATGACACATTTGAATACATG-GCAATGGGTAAAAGTTTATGATGTTTCAGTTC	725
Aed. CYP9J1	ATGAGTCACAGAAAATACATACTTTCAAAA-TCGTTGGCGACATTCGTTACTTTACGGTTC	786
CYP9J2	ATGAGACACAGAAAATACATACTTTCAAAA-TCGTTGGCGACATTCGTTACTTTACGGTTC	782
CYP9H1	AAGCCATGTCC-AGGATTAGCCCTGGTC----GGTGGTCAAGGCCATGCTATATGCCCT	701
Dros. CYP9C1Dro	AGCGCATTTTCAGAGTTTACTTTCTGGGGC----GGACTCAAAGTA-ATGCTATACATTCT	806
CYP9B1Dro	AAACCCT----AGCTTTCTCAGGGGCTTCCGTTCTTAAAGTTCATGATGTGCTTACT	725
Helio. CYP9A1V2	AAGCTATCACCAAGTTTAAAGTTTTT----AGCCTTTCTGAAAGTCTGTTCTTTCAATG	770
Fun. CYP9M3	CATTCGAAAAGTGTTT---CGTTTTCTGCGT-CTGAGCGGCATGTATAAAAGATGTGAACG	328
CYP9J14	GTTTTCCGTGGATTATG---GAAAAACTGGAAGTGGATCTGTTTG-ATCGTGAACGAAACA	322
CYP9J13	NATGCCGCGTGTGATG---CTGAAACTGAACATTGAACTG-ATGGATAAAGAAATGTGCC	316
CYP9J12	TGCGCCGAAACTGATG---MNNCTGTGAACATTGATTTTT-CTGACCCCGGAAAGAAACC	340
CYP9J11	GGTGCCGAAACTGATG---AACTGGNNMNNCTGGATCTGTTTG-ATCGTGAACAGGGCG	340
Gamb. CYP9K1	CTTCCGCGCGTGTGATG---CGTGGCCTTCGATTGCGTCTGTTTAGCGCG- AAGATGACCA	769
CYP9L1	GTTTTCCAAAGCTAATG---GCACAACTACAGATG-GACATATTCGATAGCACACAGTAC	751
Cx. CYP9C1Cul	GATTCGCGCGCAGGTGTTTATATTTTTGGGATTGGGACTGACCCCGCGTGACGTTGCCGA	743
CYP9B2Cul	GTTTCCGCGACTAGCA---AAAACTCAGAAATTCGACTGTTTG-ACCAAATGACTACGG	781
Aed. CYP9J1	GTCCCAT--TTTGCA---AAAAGTATTCAATTTTCGATTTTCGTTGGACGCGAATGTGGCAG	841
CYP9J2	GTCCCAT--TTTGCA---AAAAGTATTCAATTTTCGATTTTCGTTGGACGCGAATGTGGCAG	837
CYP9H1	CTTCCACGACTGATG---AAGTTCCTCCGCATCCAGGTG-CTGGACACCAAAGAACATTG	757
Dros. CYP9C1Dro	GATGCCAAAATGATG---AAGGCATTCGGGTCCCGGTG-ATGGACATGAATAACGTGG	862
CYP9B1Dro	TGCTCCGAAAAGTTTTT---AATTTTTCAAGCTGACTATC-TTTGACTCCACCAATGTTG	781
Helio. CYP9A1V2	CCTGCCGAGTGTGCT---CAGAAGCTGAAAGATGTCATTG-GTGCCACGTTGAGTGTTCAG	826
	*	
Fun. CYP9M3	AATTTTTATCTGGATGCGGTGAGCCGTAACATTAAACTGCGTGAACCAACCGTATTACCC	388
CYP9J14	GCTTTTTTGGGAAATTTGTGCTGGAACCCGAAAAACCCGTTGAACTGCAGGGCATTGTGC	382
CYP9J13	AGCATTTTCATGCGATGATTATGGATAAACATGAAAGTGCCTGGAAGAAAAAGGCATTGTGC	376
CYP9J12	GTTTTTTTTNMGATACCATTTCTGGAACCATGCGTACCCTGCGGATAAAAGGCATTTTTTC	400
CYP9J11	ATTATTTTACCGAAATTTATTCGTGATACCCTGAAAACCCGTTGAAGCGCATGGCATTGTGC	400
Gamb. CYP9K1	GCTTCTTCGGACACGTGGTGTGATGATACAATCACGCAGCGTGAACAGCGCGGCATCGTGC	829
CYP9L1	AGTTCCTTCCGAAAATGTTTAGGCAGTCTGTTCAAGAGCGAGAAGAGCATGGTATTGTGC	811
Cx. CYP9C1Cul	CTTTTACGAGGACATCACTTTATCCACTGTTGA-----	777
CYP9B2Cul	ATTTTCATGAGAGAAGCAGTTCTGATCGTAATTGAACAGCGTGAAGAAACAATGTTGTGA	841
Aed. CYP9J1	GTTACTTCAAAAAGTTGATTTTGGATAATATGGACCAGCGCAATAAGCAAGGTATCGTTC	901
CYP9J2	GTTACTTCAAAAAGTTGATTTTGGATAATATGGACCAGCGCAAAAAGCAAGGTATCGTTC	897
CYP9H1	ATTACTTCAGCAGCCTGGTCCACCAGCGCGATGAGGTACCGCCAGGAGCACAAAAGTGGTTA	817
Dros. CYP9C1Dro	ACTACTTCAAAAAGTGTGCTTCCGTTGCCATGAAGTATCGAAAGGAGCAGAGTATCGTGC	922
CYP9B1Dro	AGTACTTTGTACGCTGGTGGTGGATGCTATGCAGTACCGGGGAAACCAATAATCACCA	841
Helio. CYP9A1V2	ACTACTTCTCAAATGTGGTGTGACCACCGATGAAGGACAGAGAAGAACAAGGTCTGTAC	886
	*	

Fun. CYP9M3	CGGTGGAA---CAGAAAAGCGAAGGCAAACTGAGCTGGGAAGATATTGATATTGCGGGCG	556
CYP9J14	ATGTGGGCGCGGTGGATAGCCAGCATTATCAGACCATGACCCAGATGGGA-ACTGGTGGCG	549
CYP9J13	CGGTGGG---CAAAAAGCGATTACCCGTGAA--TGGAGCGAAAAAGA-ACTGGTGGCG	537
CYP9J12	ATGTGGGC-----CGTCGTGCGCATGATCGTGTGTGGAGCGATNMNGA-ACTGATTGCG	573
CYP9J11	ATGTGGGC---CAGACCAGCAAAAGCCTGCAGA---TGACCAGAACTGGA-AATGGTGGCG	567
Gamb. CYP9K1	CGGTTGAC-----TGGACCAGCAGCGA-CCTAACCCGC	963
CYP9L1	ATGAGCAGAAGATTCTTCCGGGAAGATATGGTGAAGCTCAGCGAGAATGA-AATGATAGCA	975
Cx. CYP9C1Cul	-----GTCAG--T-TAC----ACACC----AAATTGGACCCACGACGA-CCTCGTATCA	978
CYP9B2Cul	ACGTAGGCCAAA--TCTAC----ACATTCCAGGATTTGGACGGACAACGA-GCTGATATCG	1059
Aed. CYP9J1	ACGTAGGCCAAA--TCTAC----ACATTCCAGGATTTGGACGGACAACGA-GCTGATATCG	1055
CYP9J2	-----GAGTTCACCGCCGATGA-CCTGCTGGCC	933
CYP9H1	-----GAATTCACCGATGACGA-CCTGCTGGCC	1044
Dros. CYP9C1Dro	-----GACGATGA-GATCGTGGCT	918
CYP9B1Dro	ACATTGGT-----AGAAAGCAACACAATTATGAATGGACAGACTCGGA-CCTAATAGCG	1044
Helio. CYP9A1V2		
Fun. CYP9M3	CGACCAGGAGCTTTTTTTTTTGGCGG-CATTGAAA-CCACCACCACCTGCTGTGCTTTGC	614
CYP9J14	CAGTGCCCTGATTTTTTTTCTGGCGGGCTTTGATA-CCGTGGCGAACTGCCTGACCTTTCT	608
CYP9J13	CAGTGCTTTCTGTTTTTTCTGGCGGGCTTTMNA-CCATTAGCACCGCGCTGGCTTTCT	596
CYP9J12	CAGGCGTTTTATTTTTTTTTTGGCGGGCTTTGAAA-CCATTAGCTGGACCTGAGCTTTGC	632
CYP9J11	CAGTGCCCTGATTTTTTTTCTGGCGGGCTTTGATA-CCGTGAGCACCTGCCTGACCTTTCT	626
Gamb. CYP9K1	CAGTGCACCGTGTTTTTCTTCCGGCGGGTACGATA-CCGTGTCCACGTTGTCTGCATTTAT	1022
CYP9L1	CAGTGTCTGCTGTCTTCTTCCCTTGGCTTCCGACA-CAATCGCAACATCGATGACATTTGT	1034
Cx. CYP9C1Cul	-----CAATGTGCCGTATTTGTATTTGGTGGCCTTGACA-CCGTGACAAATATTGCCCTTTTCAT	1037
CYP9B2Cul	CAGTGTCTTCTTTTTCTTTTGGCCGATTCGATA-ACGTATCCAGCATCCTGACTTTCT	1118
Aed. CYP9J1	CAGTGTCTTCTTTTTCTTTTGGCCGATTCGATA-ACGTATCCAGCATCCTGACTTTCT	1114
CYP9J2	CAGTGTCTGCTATTTCTTTTGGCCGCTTTGAGA-TTATCTCGCTCTTGTGCTTCT	992
CYP9H1	CAGTGCCCTTGTCTTCTTCCGAGGATTCGAAA-CAGTGGCCACCTGCCTTAGCTTAC	1103
Dros. CYP9C1Dro	CAGTGCTTCAATTTCTTCTTCCGCGCTTCCGAAAACAACTCCAATCTGATCT-GTACCAC	977
CYP9B1Dro	CAAGCAGCGTTATTTCTTCTTCCGCGGCTTCGACA-CGGTTTCCACATCCATGTCTTCT	1103
Helio. CYP9A1V2		
Fun. CYP9M3	GAGCTATGAACTGAGCATTAAACCCGAGCATTGAGGATCGTCTGCGTGGGAAATTGATGA	674
CYP9J14	GGCGTATGAACTGACCCTGAACCGTGATATTTCAGGATCGTCTGTATGAAGAAATTGTGGC	668
CYP9J13	GGCGTATGAACTGATGCTGCATCCGGAAGTGCAGGATCGTCTGTATGAAGAAATTGTGGG	656
CYP9J12	GCTGTATGAACTGGCGGTGAACGATGATATTTCAGMNCGTCTGTTTGAAGAAATGTCATGA	692
CYP9J11	GGCGTATGAACTGACCCTGAACAAAGATGCCAGAACAACTGTATGAAGAAATTGCTGC	686
Gamb. CYP9K1	GGCGCACGAACTGCGCGTCAACCCGGACGTCCAAAGAGCGGCTGCGGGACGAGATCGACCG	1082
CYP9L1	ACTGTACGAAAGTGACGCTAGCACCGGAAATCCAGCAGCGTCTGTACGAGGAGATCCAAAC	1094
Cx. CYP9C1Cul	-----GGCCCATGAAATTGGCCATTAATCAGCACGTCCAGGTCAAATTAACGGCAAGAAATCGAGTC	1097
CYP9B2Cul	GTCTTATGAGCTTACCGTCAATCAGGATATTCAACGACGTCTCTACGAAGAAATTGACG	1178
Aed. CYP9J1	GTCTTATGAGCTTACCGTCAATCAGGATATTCAACGACGTCTCTACGAAGAAATCGCAG	1174
CYP9J2	CACCCATGAACTCTGCTTGAATCCACGGTGCAGGACAGGTTGTATGAGGAGATCATTTC	1052
CYP9H1	CAGCTACGAACTTATGATGAACCCGAAAGTGCAGAAAAAATTGCTCGGGAGATCCTGGC	1163
Dros. CYP9C1Dro	CGCCTACGAACTGCTTCGCAATCTCGACATCCAGGAGCGCTTATATGAAGAGGTTAAGGA	1037
CYP9B1Dro	GCTGTACGAAATTGGCAGTCAACCCCTGACGTACAGGACAGGCTGCTGCAGGAGATTAGGGA	1163
Helio. CYP9A1V2		
Fun. CYP9M3	AACCCGTGAAGAACTGGAAGATGGCAAAACCCGACCTATGAAATCTGCAGAAAATGAA	734
CYP9J14	GACCGATATTGATCTG--CAGCAG-AAACCGCTGACCTATGAAGCGCTGCAGCATATGAA	725
CYP9J13	CGTGGATGAAAACTG---AACGGCAAACCGCTGAACTATGAAGCGGTGCAGGGCATGCG	713
CYP9J12	AAGCGAACAGAGCCTGGAAGAAGGCAAAAGCCTGAGCTATGAAAACTGCAGAGCCTGCC	752
CYP9J11	GACCAGCAAAAGCCTG---GGCGGACGAGCCTGACCTATGATGCGCTGCAGAACATGCA	743
Gamb. CYP9K1	CGTGGCTCAACGATCGGACGCGCCGACAAGCTTAACTACGAAACGCTCCAGTCAATGCG	1142
CYP9L1	AGTTAGCGAGACATTG---GATGGCAAAGCGCTCACCTACGATGCTCTGCAGGGTATGCG	1151
Cx. CYP9C1Cul	-----CATATTGAACATAGA---GATGGACAATCAGTCACTTATGAAGACATTACTCCATGGT	1154
CYP9B2Cul	AACCGAGTCAACCCCTC---AACGGCAAACCGATAACCTACGAAGCTCTTTCAGAAGATGGC	1235
Aed. CYP9J1	AACCGAGTCAACCCCTC---AACGGCAAACCGATAACCTACGAAGCTCTTTCAGAAGATGGC	1231
CYP9J2	CGTGCACGAAGAGCTG---AAAGGTCAACCCCTGACCTATGACAAGCTGCACCAAGATGAA	1109
CYP9H1	CGTAAAGGAGCAGCTG---GGTGAAGCCACTAGACTACGACCCCTGATGGGCATGAA	1220
Dros. CYP9C1Dro	AACCCAAAGAGGCACTA---AAGGGTGCACCCCTCACTTACGACGCGCGGAGGATGAC	1094
CYP9B1Dro	GTATGATGAGAAG-----AACCATGGGAAGATTGATTATAATGTCTTCAGAGCATGAC	1217
Helio. CYP9A1V2		

5'-GAYATGGTYGTRWSCGARACRCT-3'

R

Fun. CYP9M3	ATATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCCTG-----	765
CYP9J14	ATATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCCTG-----	756
CYP9J13	TTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCCTG-----	744
CYP9J12	GTATCTGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCCTG-----	783
CYP9J11	GTATATGGATATGGTGGTGAGCGAAACCCCTG-----	774
Gamb. CYP9K1	CTATCTGGACATGGTCCGGAACGAGACGCTCCGCAAGTGGACACCGGCACCGTTCTCTCGA	1202
CYP9L1	GTATCTGGATATGGTGGTATCGGAAACGCTACGCAAGTGGTCACCATCACCAGGTACCGA	1211
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	GTACTTGGACCAAGTCTTACAGAAACTCTTCGCAAAATGGCCCCAGGCGATTTTCATCGA	1214
Aed. CYP9J1	CTACTTGGATATGGTGGTATCGGAGACTCTTCGTAAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1295
CYP9J2	CTACTTGGATATGGTAGTATCGGAGGCTCTTCGTAAATATCCCACAGCGACTCTGACGGA	1291
CYP9H1	GTATCTGGACATGGTGGTACTCGAAGCACTTCGTAAATGGCCACCATCGATTTCCACCGA	1169
Dros. CYP9C1Dro	ATATCTGAACTGGCTGGTCTCCGAGTCCGCTGAGAAAGTGGCCACCAGGCTTCATCGTGA	1280
CYP9B1Dro	CTACATGGACATGGTCACTCCGAGTCCCTTCGAAAGTGGACCCTTTCGGCAGCAGCAGA	1154
Helio. CYP9A1V2	GTATTTGGATATGGTGGTITCTGAGGGACTTCGATTATGGCCCCACGCTGCAGTTGTAGA	1277
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	CCGCACCTGCACCAAACCGTACATGCTGGAGGACTATGACGGCCGGCGGGTGCAG-----	1257
CYP9L1	TCCAATGTGCAACCAAGACTATACTATTCCCGGTGAT-----CCAGACATCGTT-----	1260
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	TCCGCTCTGTACAAAACCGTATGATCTGAACGTTGATGGTTCGAATG-ATTTCCG-----	1267
Aed. CYP9J1	CCGTTACGTCAACAAAGGACTACGCTTCCGATGACGAAAGGACTTCGCTTCGTC-----	1350
CYP9J2	CCGTTACGCCAACAAAGACTACGCTTCCGATGACGAAAGGACTTCGCTTCGTC-----	1346
CYP9H1	TCGTGAGTCCGCTCAGGATATTGATTTGTTTCGATGAAAATGGTTCAGAAAGTTGTTCTC---	1226
Dros. CYP9C1Dro	TCCAATGTGTGGTCTGATTTCCAGTTGAAGGATGAGGAAAGCCAGGTTGGTGTAA---	1337
CYP9B1Dro	CCGGCTCTGCGCCAAGGATTACACGCTCACAGATGATGAAGGCACCAAGCTTTTCGA---	1211
Helio. CYP9A1V2	CAGACTCTGTGTAAGGACTACAATATTGGAAGACCCAATGAACAGGCTCAGAAAGATTT	1337
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	----CTGCAGCCGGGTGACGGTCTGTGGATACCGCCCGCGCCATCATGCGGACCCGCA	1313
CYP9L1	---ATTCCCAAGGGTGCTACCGTGTATTATCCCGATTGCTGGTTTGCATTATGATCCTCG	1316
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	----TGAAGCAAGGTGACACAATTTGGATCCGGCTCTTCTATGCACCCGAGATCCTCG	1322
Aed. CYP9J1	---ATCGAAAAGGGCAAAACCATTTGGATCCCAATGCTAGCCCTTCACCACGACCCGAA	1406
CYP9J2	---ATCGAAAAGGGCAAAACCATTTGGATCTCAATGCTAGCCCTTCACCACGACCCGAA	1402
CYP9H1	---CGCCCGAAAAGGGTGATGTCTTGCAAAATACCTATCTTCTCGCTCCATCAGATCCCGA	1283
Dros. CYP9C1Dro	---CCTGCGGGAGGACGACTTAGTGCACATCAACGTGGGGGCACTTCATCAGGACCCGGA	1394
CYP9B1Dro	---GTTTAAGGCAGGGGATAATATAAACATTTCCATCTGTGGGTTGCACTGGGATGAGCG	1268
Helio. CYP9A1V2	GATTATTATACCGGCCAGGCTGTGGCAATATCTCCCTGGTTGTTCCACAGGAACCCGAA	1397
Fun. CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb. CYP9K1	GCTCTTCCCTGAGCCGGATCGGTTCTGGCCGGAGCGGTTCCGAGCCGGAATCGGCCGGTGC	1373
CYP9L1	TTTTTATCCAGATCCAGATCGTTTCGATCCAGAACGTTTCAATGATGAG-AATAAGCACA	1375
Cx. CYP9C1Cu1	-----	
CYP9B2Cu1	CTACTTCTCAGATCCGGAAGTTTTTGGATCCAGATAGATTTGCTTCAGAT-CGGCG--CGA	1379
Aed. CYP9J1	GTACTTCCCGGAGCCGGAACGTTTCGATCCGGAGCGCTTCAGCGAAGAC-AACCGATCGA	1465
CYP9J2	GTACTTCCCGGAGCCGGAACGTTTCGATCCGGAGCGCTTCAGCGAAGAC-AACCGATCGA	1461
CYP9H1	GAACTTCGAGGATCCGGAGTCTTCAATCCGGAGCGCTTCGAGATGGT---CAT-----	1335
Dros. CYP9C1Dro	TAACTTCCCGGAACCCGAGCAATTCGACCCGGAGCGCTTTGACGAGGAG---CACAAAGCA	1451
CYP9B1Dro	CTTCTTCCGCAACCCGAGGTTTGACCCAGAGCGATTTAGCGAAAGG---CGTAAAAA	1325
Helio. CYP9A1V2	GTTTTTCCCGAACCCGCAAGTTTCGACCCGTAAAGGTTCTCACCAGAA---AACAGACA	1454

Figura 35. Alineamiento completo de secuencias de proteína de la familia CYP6 y CYP9 de insectos.

Los residuos conservados están marcados pro cuadros. Los residuos idénticos o altamente similares están marcados con asteriscos y puntos. Fun: *A. funestus*. Gamb: *A. gambiae*. Min: *A. minimus*.

```

Fun. CYP6P1      -----
CYP6P9      -----MELINAVLAAAFIFVVSAYVLFIRNKHNYWKDNGFPYAPNPHFLFGHAKGQAQT 53
CYP6P5      -----
CYP6P4      -----
CYP6Y1      -----
CYP6N2      -----
CYP6M1      -----
CYP6M8      -----
CYP6M7      -----
CYP6AA4      -----
Gamb. CYP6P3      -----MELINAVLAAAFIFAVSIVYLFIRNKHNYWKDNGFPYAPNPHFLFGHAKGQAQT 53
CYP6Z1      -----MILYTTIGLIVAFVFLALKYVYSYWDQRQLPNLRPEIPYG--NLRILA 45
CYP6P2      -----MELLTLTLLSLLVALATGLYLFVRNRNYWNSNRQFPTLPNQKLLFGHVKGVNTE 53
Min. CYP6P7      -----MELVTTLLSLLFVLASGLYWFVRNRNYWNRGFPPTVPNQKLLYGHVKGVTNTE 53
Fun. CYP9L4      -----
CYP9M3      -----
CYP9J14      -----
CYP9J13      -----
CYP9J12      -----
CYP9J11      -----
Gamb. CYP9K1      -----
CYP9L1      MEINLMYVIGIVSVLVALYVYLTHNMDFFKKYPIPCLPVEPLFGSSRQFLKKISFSEFV 60

Fun. CYP6P1      -----
CYP6P9      RDDPLSAHLFALEGNPWRLRQKLTPTFTSGRMKQMFGLWDVALELDKYME-ENYRQPD 172
CYP6P5      -----
CYP6P4      -----
CYP6Y1      -----
CYP6N2      -----
CYP6M1      -----
CYP6M8      -----
CYP6M7      -----
CYP6AA4      -----
Gamb. CYP6P3      KDDPLTGHLFALEGQPWRLMRQKLTPTFTSGRMKQMFGTIRDVGLLEKCE- QSYNQPE 172
CYP6Z1      HSDPMSANL FALPGQRWKNLRAKLTPTFTSGQLRHMLPTFLAVGSKLEQYLERLANEKQI 165
CYP6P2      EIDPLSGTLFALQGKAWKILRQKLTPTFTSGKMKQMFATVLEVAERLQHVVA-THTG--Q 170
Min. CYP6P7      EVDPLSGTLFALQGKPKWILRQKLTPTFTSGKMKQMFTTIRDVAEQLGTYVD-EHLHQEE 172
Fun. CYP9L4      -----FTGSKMRQMFSLIVECSENMIHSLAHS-----AQE 30
CYP9M3      -----FTGSKMRSMFGLLSKSAGDAMDRLVMFS-RDK--SFT 34
CYP9J14      -----AKCVTMFQQVVECSSGMVQYKKQTDIN--GQC 31
CYP9J13      -----QMFELMSESCQGMVQHLLLEEARADE-SKQV 29
CYP9J12      -----FTGSKMRMLFALIAECGQTMVAHFRSEEQKAGGTGVQ 37
CYP9J11      -----FTGSKMRQMFELIVECSANMAKHYREEIRMGVSSRE 37
Gamb. CYP9K1      FGRALFAMRDTRWRNMRTLLSPAFTGSIKMRMLFGLITSYCDGAVRTTIRSELGADG--TAE 61
CYP9L1      FSKILFNLTGQRWRNVRTLLSPTFTGSKMRQMFAMILECSDNMVQALAHPT-----GRE 174
FTGSKM

```

```

Fun. CYP6P1 -----
CYP6P9 IEMKDV LGRFTT D VIGTCAFGIECNTLKTDP DSEFRKYGNKAFEFN-LMI FLKTF LASSAYP 231
CYP6P5 -----
CYP6P4 -----
CYP6Y1 -----
CYP6M2 -----
CYP6M1 -----
CYP6M8 -----
CYP6M7 -----
CYP6AA4 -----
Gamb. CYP6P3 VEMKDI LGRFTT D VIGTCAFGIECNTLKT D DSEFRKYGNKAFELN-TMIMMKTFLASSYP 231
CYP6Z1 VDMRDIVSRVYVLDVVASVFFGF EANCLHDPDDAFRVALRDLNMPDSFMNNIRTAGVFLCP 225
CYP6P2 MEMKDV LARYTT D VIGTCAFGIECNTLRNPDSDFLKYGNKVFEQK-VSTMIKIILVLMGR 229
Min. CYP6P7 LEMKEILVRYTT D VIGTCAFGIECNTLKD P DSEFLKYGNKVLDQK-VSTMIKIIFIMVMR 231
Fun. CYP9L4 CELKGLFINFTNDVIASCAFGVRLNTFQDRDNVFFRYGKNLTFNGRLHVF LKIMGYQVFP 90
CYP9M3 MELRDLYSRLGMDVMSSISFGVEVDSLTDRENEFFLKGKRLAQIDG-LPGLKFLMATTIP 93
CYP9J14 YELKEVFSRYTT D VIASCAFG LKVD SFRDSTNGFYTSGQRMIDFARFKVLLKVLAYRLF 91
CYP9J13 HEMKDI FTRLANDVIASIAFGIQVNSF SERENDFYKRGKXLLDFTSFWP SIFRMLFMXMP 89
CYP9J12 LEMKDV MTRFANDVIGTAAFGIKVDSFRDPTNQFISMARSVTSQESXVKVLKMLGFTFAP 97
CYP9J11 HEMKDV FTRYANDVIATCAFGIKVDSLKNADNDFYVNGKMMMAFNRP IVM LKLGIFRVVP 97
Gamb. CYP9K1 LEMKEL FRRFGNDIVATCAFGIEIN SFRDRANAF T L GKE LTNLDG-VQGLKFLAFSSFP 120
CYP9L1 CEVKDL FIRFTNDVIASCAFGVHWNSFRDKDNVFFRYGKDL SNFSRLKVALKIMGYQVFP 234

```

```

LYELAK
Fun. CYP6P1 -----LYELAKNPD IQERLRDELNRAIETN 26
CYP6P9 VGKGEVGTQRELAAQAFIFFLAGFETSSTTQSFCLYELAKNPD IQERLRQEI NQAI EEN 351
CYP6P5 -----ELAAQVLIFFFLAGFETSSTT LSFCLYELAKNPGIQDRLRDEITRAIDN 49
CYP6P4 -----LAKNPD IQERLRREEIERGVEDH 22
CYP6Y1 -----DFSLYELAKQDQVQDKARQC VKETLQKY 28
CYP6N2 -----ALNEQIQRARQC VLD AVK KH 21
CYP6M1 -----LNPEIQEKGRKCVKEILEKR 20
CYP6M8 -----LYELALNPEVQEQGRKCVREV LK KH 25
CYP6M7 -----LYELALNQDAQDKGRRCVKEVLERH 25
CYP6AA4 -----LYELAKNPD IQERVRAEVLEK LKH 25
Gamb. CYP6P3 LGRKGEVGTQNELAAQAFVFFFLAGFETSSTTQSFCLYELAKNPD IQERLRREEINRAIAEN 351
CYP6Z1 -SSGEETLTDAAQCAANVFLFYGAGADTSTGTITFTLHELTHNAEAMAKLQREVD EMMERH 336
CYP6P2 IGKGEVGTMMNELAAQVFIFFFLAGFETSSTTMNFCLYELAKHPD IQERLRREIERAVEEN 349
Min. CYP6P7 VGKGEVGTQNELAAQVFIFFFLAGFETSSTTMNFCLYELAKNSELQERLRKEINRALEAN 351
Fun. CYP9L4 -----LLMQANKGK LHHQPQDRDEVES-- 154
CYP9M3 -----LLQARKNTLGAEKHDD ETLQ-- 156
CYP9J14 -----LLMQARKGILKRHKQEES----L 153
CYP9J13 -----ILMQVKRGMLSHQRD--EPDV--K 151
CYP9J12 -----LLMQARKGSLKHQAEEPKQEXGT 163
CYP9J11 -----LLMQARKGTIKREQRETEDRE--E 161
Gamb. CYP9K1 -----LLMQARKQELRFD E MENIETN--- 183
CYP9L1 -----LLIQARKGQLRYQPQESEETD G-- 298

```

Fun. CYP6P1	DGELTYEVVMGQEYLGQVVMETLRKYPPLETTLRVTAQDYRIPGTDHVIIPRNQVGVQVPVF	86
CYP6P9	DGQVTYDVAMNIQYLDVNETLRKYPPVESLSRVPSVDYVIPGTHKVIIPKRTLQVQIPVH	411
CYP6P5	GGEVITYDVAMNIQYLDVNETLRKYPPVETLTRKPAHDYVIPGTHKLIPEGAIVQIPIY	109
CYP6P4	GGQVTYEMVMNQQYLDVNETLRKYPPVIESLSRVPIRDYTIIPGTHKVIIPKDTFIQIPVY	82
CYP6Y1	GGKLSYEAVSDMSYLDQCINETLRKHPPVAILERNADKDYRLPDSGLLLRRGQKIMIPY	88
CYP6N2	G-GLSYEALMDMPYIDQRINESLRKYPPGANLIRQVSDYRVPDWTFFPKGMVMVPIVY	80
CYP6M1	NGEMTYEALDMKYLDQILNETLRKYPPVPMHFRMTTQDYRVPNTDSVIEAGTRVLIPIF	80
CYP6M8	NGEMSYDAVDMKYLDQILNESLRKYPPVPMHFRVASKDYQVPGTKSVLEAGTAVMVPVH	85
CYP6M7	NGELTYDAVEMHYLDQIPKESLRKYPPVPMHFRVASKDYQVPGTKVLEAGTAVMVPVY	85
CYP6AA4	DNQITYDALKEMTYLDQVINETLRMYPPVPLIRVATQPYAVAGTNVTLDRDTMLMVPYI	85
Gamb. CYP6P3	GGEVITYDVVMNIKYLDVNETLRKYPPVESLTVRVPVSDYLIIPGTHKVIIPKRTLQVQIPAY	411
CYP6Z1	HGEITYDNITGMKYLDLCVKETLRIYYPALAVLNRECTIDYKVPDSDTVIRKGTQMIIPLL	396
CYP6P2	GGEITYDVVMGTEYLMWVVDNETLRKYPPLETYVTRAPEHDYTVPGTAHWIPKGTMIQIPIY	409
Min. CYP6P7	GGEITYDVVMGIEYLNKVVDETLRKYPPLESITRAPEQDYTIIPGTHKVIIPKGTMIQIPIY	411
Fun. CYP9L4	---FATAKESNDKLNLPGNVVTLSAEMVAQCLIFFLAGFDIVATSMISFLMYELTIAPDI	211
CYP9M3	DAGFSTAQTHAVEQKG-EGKLSMEDIDLAGATASFFFGGIETITTLFCFASYELSNPSI	215
CYP9J14	AEGFATAQESDVGAVDSQHYQTMQMLELVAQCLIFFLAGFDIVANCLTFLAYELTLNRDI	213
CYP9J13	DAGFATVHESAVGKKA--ITREWSEKELVAQCFLFFLAGFXTISTALGFLAYELMLHPEV	209
CYP9J12	GDGFATVEESHVGRRA--HDRVWSDXELIAQAFIFFFAGFETISWTLSFALYELAVNDDI	221
CYP9J11	VKGFATVEESDVGQGTG--KGLQMTLELMVAQCLIFFLAGFDIVSTCLTFLAYELTVNKDA	219
Gamb. CYP9K1	GGGSQKRSV-----	192
CYP9L1	---FATAKESNEQKILPEDMVKLSNEMIAQCLIFFLAGFDIATSMITFVLYEVTLAPDI	355

PFGE GP

Fun. CYP6P1	AIHRDPEHYDPPECDFPDRFSAEECKKRLPYTFLPFGE GP-----	126
CYP6P9	AIQHDPEHYDPERFD PDRFSPPEEVKKRHPFTFLPFGE GP RVCIGLRFVGMQTKVGLITL	471
CYP6P5	AIQRDPDHFPDPERFD PDRFTPEEVKKRHPYVYL-----	143
CYP6P4	AIQRDPEFYPEPDQFN PDRFLPEGVKQRHPYVFLP-----	117
CYP6Y1	AMHHDSTHFPDPEQYRPERFSPPEEVAKRDPYCYL PFGD GPR-----	129
CYP6N2	AIHHDPEHYDPERYD PDRFAADASEARKPYSFIPFGE GP-----	120
CYP6M1	AIQRDSDFPEPEKFDPERFSPPEEEAKRHPFAMI-----	114
CYP6M8	AIHHDPAVFPDPERYDPERFSPPEQAKRHPYAWTPFGE GP-----	125
CYP6M7	AIHRDPEHFPNPD LFD PDRFTPEEEAKRHPYAWTPFGE GP-----	125
CYP6AA4	AIHHDATIYPDPKRFD PDRFATDALHSRHTHAFLPFGE GP-----	125
Gamb. CYP6P3	AIQRDPDHYPDPERFNPDRFLPEEVKKRHPFTFIPFGE GPRICIGLRFGLMQTKVGLITL	471
CYP6Z1	GISMNEKYFPEPELYS PERFD-EATKNYDADAYY PFGAGPRNCIGLRQGLLSKIALVMM	455
CYP6P2	ALHHDAAQYYPDPERFDPERFRPEVANARPAYVYMPFGE GPRICIGLRFGLMQTKVGLITL	469
Min. CYP6P7	ALHHDPEYYPEPERFDPERFQPEVANARPPYVYMPFGE GPRICIGMRFGMMQTKVGLITL	471
Fun. CYP9L4	QQRLYEEILQASESPG-WKSLTYDALQGHRYLDMVVSETL	250
CYP9M3	QDRLRAEIDETREELEDGKTPTTYEILQKMKYLDMVVSETL	255
CYP9J14	QDRLYEEIVATDIDLQ-QKPLTYEALQHKMYMDMVVSETL	252
CYP9J13	QDRLYEEIVGVDEKLN-GKPLNYEAVQGHRYMDMVVSETL	248
CYP9J12	QXRLFEEVHESEQSLEEGKLSYKQLQSLPYLDMVVSETL	261
CYP9J11	QNKLYEEIRATSKSLG-GSSLTYDALQNMQYMDMVVSETL	258
Gamb. CYP9K1	-----	-----
CYP9L1	QQRLYEEIQVSETLD-GKALTYDALQGHRYLDMVVSETL RWSVSPGTRMCMNQDYTIP	414

Fun.CYP6P1	-----	
CYP6P9	LRKFRFSPSARTPDCVKFDPKMIILSPIAGNYLKVEKL-----	509
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6P3	LRKFRFSPSARTPERVEYDPKMITIAPKAGNYLKVEKL-----	509
CYP6Z1	LSRFNFS--ATIPRKIKFEPVSITLAPKGGGLPMRIENRVKH-----	494
CYP6P2	LRQFRFSPTTEQTPDRIRFMPNVFVLSPSDGNYLEVEKL-----	507
Min.CYP6P7	LRQFRFSPTAKTPETIRFMPNVFVILSPDRGNYLHVEKI-----	509
Fun.CYP9L4	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb.CYP9K1	-----	
CYP9L1	GDPIDIVIPKGATVFIP IAGLHYDPRFYDPDRFDPERFNDEKHKIPLGAYLPFGIGPRM	474

Fun.CYP6P1	-----	
CYP6P9	-----	
CYP6P5	-----	
CYP6P4	-----	
CYP6Y1	-----	
CYP6N2	-----	
CYP6M1	-----	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6P3	-----	
CYP6Z1	-----	
CYP6P2	-----	
Min.CYP6P7	-----	
Fun.CYP9L4	-----	
CYP9M3	-----	
CYP9J14	-----	
CYP9J13	-----	
CYP9J12	-----	
CYP9J11	-----	
Gamb.CYP9K1	-----	
CYP9L1	CIASRFALMEVKAIIVYHILLNVEKRSERTSVPVKLAKGFSPLKPENGMYLKFNPRMKN	533

Figura 36. Alineamiento completo de secuencias de mRNA de la familia CYP6. Los cuadros señalan las regiones donde se hibridizan los iniciadores específicos para CYP6P3 de *A. gambiae*. F: iniciador forward. R: complemento reverse del iniciador reverse. Gamb: *A. gambiae*. Fun: *A. funestus*. Min: *A. minimus*.

	5'-AGCTAATTAACGCGGTGCTG-3'	
	F	
Gamb.CYP6P3	ATGGAGCTAATTAACGCGG---TGCTGCGCGGTTTCATCTTCGCAAGTGTGATCGTGAT 57	
Fun.CYP6P9	ATGGAGCTAATTAACGCGG---TGCTGCGCGGTTTCATCTTCGAAAGTGTGCGCAAGTGTAC 57	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	-----ATGATCCTTTACAGCATCGGACTGATCGTGGCGTTTGTTTTC 42	
CYP6P2	ATGGAGCTCTTGACCTTGA---CTTTGTCGTGCTGGTCCGCGCTCCGCAACCGGGCTGTAT 57	
CYP6M1	ATGTGTTCCCAACCATAGAAATTCCTGTAGCGCTTCTGGCACTACTCGGTGGAGCAGTG 60	CYP6P3
Min.CYP6P7	ATGGAGCTCGTAACATA---TTTTATCAITACTATTTGTGCTAGCGTCCGGGCTGTAT 57	
		R 5'-TACGCTCCGAATCCACACTT-3'
Gamb.CYP6P3	R [CTGTTTATACGCAATAAGCATAACTATTGGAAGGACAATGGATTTCCTACGCTCCGAAT] 117	
Fun.CYP6P9	R [CTTTTTCATTCGGAACAAACATAAATTACTGGAAGGACGATGGATTCCCTATGCGCCGAAAC] 117	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	CTCGCCCTCAAGTACGCTACTACTGCTACTGGGATCGACAGGGGCTCCGCAAT---TTGAGG 99	
CYP6P2	CTGTTTGTGCGCAACCGGTACAATTACTGGAGCAACCGTCAAGTTTCCACCCTGCCCAAC 117	
CYP6M1	TACTTTTATCGTACGCAAAACAATCCTACTGGAAGGAGCGTGGCGTACCCGCAC---CCAAAG 117	
Min.CYP6P7	TGGTTCTTGGCAATCGGTACAATACTGACTAACCGTGGCTCCCGACCGTTCCCAAT 117	
Gamb.CYP6P3	CCACACTTTTGTTCGGGCATGCGAAGGG--CCAGGCCAGACGGCGGCACGGCCGCGACAT 176	
Fun.CYP6P9	CCACATTTTCTGTTCGGACACGCGAAAGG--ACAGGCCAGACAAGGCATGCGCCGCGACAT 176	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	CCCGAAATTCCTACGGCAAT--CTACGCATTTAGCCCAAAGAAAGAAATCCTTCAATG-- 157	
CYP6P2	CAAAAGCTACTGTTTGGCCACGTAAAGGGTGTAAATACCGA--GCGGCACGCTTCGTACAT 176	
CYP6M1	CCAAACATTTCTTCGGCAGCTTCAAAGATGCGCGCACGAA--GATACACTTCACCGAGG-- 175	
Min.CYP6P7	CAAAAGCTGCTGTACGGACACGTTAAGGGCACCAACACTGA--GCGTACGCGCTCGTACAT 176	
Gamb.CYP6P3	CCATCAGGAGCTGTACCGATACTTCAAGCAGCGGGCGAACGGTACGGCGGCATTAGCCA 236	
Fun.CYP6P9	CCATCTGGAAGTGTACAAAAAATTCAAGCAGCGCCGTGAGCGGTACGTTGGTGTGAGCCA 236	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	-----TGGCTATTAACGATCTGTACGACCGTTCCAGTGAACGGTTGGTTGGAGTGTATCT 212	
CYP6P2	CTCGAGTGAATCTATCCGAGTTTAAAGAACCGTGGTGTATGATTTTGGCGGCTTCAACAT 236	
CYP6M1	--AGGTAGAAGCTTACTACGCCATTTACAAAAGGGAAACACCCGTTTCATGGCGGTGTACAT 233	
Min.CYP6P7	CACGGCCGAAATTTACCAGCAGCTGAAAAAGCGTGGTGAATCATTCGGTGGCTTGAACGT 236	
Gamb.CYP6P3	GTTTATCGTGCCCTCGGTGCTGGTGTATCGACCCGGAGCTGGCGAAGACGATCCTGGTGAA 296	
Fun.CYP6P9	GTTTCATGATACCTTTCATTGCTCGTGTATCCAGAGCTGGTGAAGACGATCCTAGTAAA 296	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	GTTCTTCGGCCAGCGATCCTGGTCCGGGATGCGCATCTCGCCAAGCGGATAATGGTGAA 272	
CYP6P2	GTTTCGTATACCGGCGGTAATGGCGATCGATCCGGAGTTTCATCAAAAACGATCTCGTCAA 296	
CYP6M1	GCTGACGACACCGGTCGTACTGCCGCTGGATCTGGAGCTGATCAAGGCGATCTTCGTGAA 293	
Min.CYP6P7	GTTTATCATACCGGCGGTATGGTGGTGTATCCGGAGCTAATCAAAAACGATCTGGTGAA 296	
Gamb.CYP6P3	GGATTTTAAAGTGTTCACGATCAGGGCGTGTTCACCAATGCAAAGGACGACCCGCTCAC 356	
Fun.CYP6P9	GGACTTTAATGTATCCACGATCATGGTGTATTCAATAATGCAAGAGACGACCCGCTGTC 356	
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	CGATTTCCAGCACTTTCACGACCGTGGCGTCTACTGCAACGAGCACAGTGTATCCGATGTC 332	
CYP6P2	AGATTTCCACATCTTTCACGACCGGGTCTGTTTCAGCGATCCCGAGATAGATCCACTGTC 356	
CYP6M1	GGATTTCCAGTACTTTCACGATCGCGGCAGTACTACAACGAAAAGCAGCACCACCTGAC 353	
Min.CYP6P7	GGATTTCCACATCTTTCACGATCGAGGACTGTTTCAGTGTATCCCGAAGTTGATCCCTGTC 356	

Gamb.CYP6P3	GGGACATCTGTTCCGCACTGGAGGGCCAAACCGTGGCGGTTGATGCGCCAGAAGCTTACGCC	416
Fun.CYP6P9	CGCACATCTTTTTGCGCTTGAAGGTAACCCATGGCGCTTGTTCGCGTCAGAAGCTCACGCC	416
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	GGCCAACTGTTCGCCCCTGCCCGGCCAGCGGTGGAAAAATCTGCGTGCAGGCTTACACC	392
CYP6P2	CGGCACGCTGTTTCGCGCTGCAGGGCAAGGCGTGGAAAGATCTGCGCCAAAAGCTCACGCC	416
CYP6M1	CGCCCATCTGTTCAATTTGGAGGGTCAAAAAATGGCGCAATCTTCGCAACAAGATGACACC	413
Min.CYP6P7	CGGCACGCTGTTTCGCGCTGCAGGGCAAAACCGTGGAAAGATTTTTCGCGCCAAAAGCTAACGCC	416
Gamb.CYP6P3	GACGTTACCTCGGGCCGAATGAAGCAAATGTTCCGCACAATACGGGATGTGGGGCTTGA	476
Fun.CYP6P9	AACGTTACCTCAGGTCGCATGAAGCAAATGTTTGGTACACTATGGGATGTAGCACTTGA	476
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	AACCTTCACCTCCGGCCAGCTACGGCACATGCTGCCAACGTTTCTGGCAGTGGGCAGCAA	452
CYP6P2	CACCTTCACGTCGGCAAGATGAAGCAAATGTTTCCACGGTGTGGAGTGGCCGAACG	476
CYP6M1	CACGTTACGTCGGGAAGATGAAGATGATGTTCCCGACGGTGGTGGCGGGGGCCAGCA	473
Min.CYP6P7	CACATTTACCTCCGGCAAGATGAAGCAAATGTTTACCACGATACGGGATGTGGCGGAACA	476
Gamb.CYP6P3	GCTGGAAAAGTGTATGGAGCAAAGC---TACAACCAACCGGAGGTGGAGATGAAGGATAT	533
Fun.CYP6P9	GCTGGCAAAGTATATGGAAGAAAAC---TATCGTCAGCCGGATATTGAGATGAAGGATGT	533
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	GCTCGAGCAGTATCTCGAACGCTTGGCAAACGAAAAACAGATCGTGCACATGCGTGACAT	512
CYP6P2	GTTGGGCCAGCAGCTGGCCACGCAC-----ACCGACAGA--TGGAGATGAAGGACGT	527
CYP6M1	GCTCGGAGACTTCATGGAGAAAACGTCAGAAGCACGGTGGAGATGGAGCTGAAAGATGT	533
Min.CYP6P7	GCTCGGTACCTATGTGGACGAGCAC---CTGCACCAGGAAGAGTTGGAGATGAAGGAAAT	533
Gamb.CYP6P3	CCTGGGCCGTTTTTACGACGGACGTGATTGGGACGTGCGCGTTCCGGCATCGAGTGCAATAC	593
Fun.CYP6P9	GCTAGGTCGGTTTTACGACAGATGTGATTGGCACCTGTGCATTCCGGGATTGAGTGAATAC	593
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	CGTTTTCCGCTACGTGCTCGATGTGGTGGCTTCAGTGTTTTTCCGGCTTCGAAGCCAACGTG	572
CYP6P2	GCTGGCCCGCTACACGACCGATGTGATCGGGACGTGCGCGTTCCGGCATCGAGTGCAATAC	587
CYP6M1	GATGGCCCGCTTACGACCGATGTGATTGGGACGTGCGCGTTCCGGAATCGAGTGAACAG	593
Min.CYP6P7	TCTGGTGCGATATACGACGGATGTGATCGGTACGTGTGCGTTTTGGGATCGAGTGAACAC	593
Gamb.CYP6P3	ACTTAAGACGACAGACTCGGAGTTCGCAAGTACGGCAACAAGGCCTTCGAGTTGAATA-	652
Fun.CYP6P9	GCTTAAGACACCGGACTCGGAATTCGCAAAATACGGCAACAAGGCCTTTGAGTTTAATC-	652
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	TCTGCACGATCCCGACGATGCGTTCCGTGTGGCGTTGCGTGATCTTAACAATCCGGACAG	632
CYP6P2	GCTGGCAACCCGGACTCGGACTTTCTCAAGTACGGCAACAAGTGTTCGAGCAGAAGG-	646
CYP6M1	TATGCGTGATCCGGATGCGGAGTTCGCGGCGATGGGGAAACTGTTTGTGGAACGGCAAC-	652
Min.CYP6P7	GCTGAAAGATCCGGACTCGGAATTCCTCAAGTACGGCAACAAGTGCTCGATCAGAAGG-	652
Gamb.CYP6P3	--CGATGATCATGATGAAGACTTTCTCGCGTCTGCTCTACCCGACGCTGGTGGCAATCT	710
Fun.CYP6P9	--TGATGATTATTCTAAAAACTTTCTTAGCATCGGCTTATCCGTCACTTGTGCGGAAAAC	710
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb.CYP6Z1	CTTTCATGAACAACATCCGAACAGCCGGCGTTTTTCTGTGTCCCGGCTGCTAAAAGTTTAC	692
CYP6P2	--TGTCACCATGATCAAGATCATTTTTGGTGTGATGGGGCGAAAAGATTTCCAGCAAGTT	704
CYP6M1	--CGTCGAGTTTTGTAACATGA--TGGTTCAATTCTACCGAAAACGTCCCGGCTGTT	707
Min.CYP6P7	--TGTCACCATGATTAATAATCATTTTTATTATGGTGTGCGTAAATTTAAATCCAACCT	710

Gamb. CYP6P3	GCACATGAAGATCACGTCACAACGATGTGGAGCGATTCTTCCTGGACATCGTGAAGGAAAC	770
Fun. CYP6P9	GCGAATGAAGATAACATTTCGACGATGTGGAACAGTTTTTCTTAAAAAATTGTTAAGGAAAC	770
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6Z1	CGGCATCAATTCGCTATCGCCTCCGATGAAAAAGTTTACCACAGAAGTGATCAGTTCCCA	752
CYP6P2	TACGCTCAAAATTACCAGCCGCGATGTGAAAACGTTCTTCATGAATCTGGTCCGCGAAAC	764
CYP6M1	GGGCATACGGTTTATCGATAAGGAAAGTGTCCGGCTTCTTTCTGAAGGTGGTCCGCGATAC	767
Min. CYP6P7	TGTGTTGAAAAATCACCCGATGCGGATGTGGAATCGTTTTTCTGAACCTCGTGAGGGAAAC	770
Gamb. CYP6P3	GGTCGACTACGGGAGGCGAACAACGTGAAGCGGAACGACTTCATGAACCTGATGCTGCA	830
Fun. CYP6P9	GGTAGAATATCGAGAAAAGTAAACAACATTAACCGAAACGACTTCATGAACCTGCTGTTGCA	830
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6Z1	TCTGCACCAGCGTGAGACGGGCCAGGTGATGCGCAAGGACTTTATCCAGATGCTAACGGGA	812
CYP6P2	GGTCGAGTATCGGGAGCGGAACAATGTGAAGCGCAACGATTTCTTGAACCTGCTGCTGCA	824
CYP6M1	GATTGACTATCGGGTTAAGAATGGCATACAGCGGAATGACTTTATGGATCTGATGATACG	827
Min. CYP6P7	GGTCGAATACCGAGAGAACAACAATGTGAAGCGGAACGATTTCTTGAACCTGTTGATGCA	830
Gamb. CYP6P3	GATCAAGAACAAGGGCAAGCTGGACGATAGTGATGACGGTAGTTTGGGCAAGGGAGAGGT	890
Fun. CYP6P9	GATTAAGAATAAGGGTAAGCTGGACGACAGCGATGATGGGAGTGTGGCAAGGGTGAAGT	890
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6Z1	TCT-----GCGCGCAAGGCTGGTAG-----CAGTGGGGAAGA	845
CYP6P2	GATCAAAAACACTGGCAAGCTGTGGGAAGGGGAGGAGGACCACATTGGCAAAAGGGAGGT	884
CYP6M1	GAT-----GCTGCGGGACACAGAG-----AACCCGGAGGA	857
Min. CYP6P7	GATCAAAAACACAGGGAAACTGTGGGAAGCGGAGGAGGAACACCGTTGAAAAGGGTGAAGT	890
Gamb. CYP6P3	CGGCATGACACAGAACGAGCTAGCGGCCAGGCGTTTGTGTTTTCTTGGCGGGTTTTGA	950
Fun. CYP6P9	AGGAATGACACAACGAGAACTAGCGGCACAGGCATTCATTTCTTCTTGGCCGGTTTCCA	950
CYP6M8	-----	
CYP6M7	-----	
CYP6AA4	-----	
Gamb. CYP6Z1	AACGCTCACCAGTGCACAGTGTGCGGCCAATGTGTTCTGTTTTACGGTGTGGGGCCGA	905
CYP6P2	CGGCATGACGATGAACGAGCTGCGGCCAGGTTTATCTTCTTTTGGCCGGCTTCCA	944
CYP6M1	ACCCCTTACCTTCAACGAGGTGGCGGCAAGCGTTTGTGTTCTTCTTTGGTGGTTTGA	917
Min. CYP6P7	CGGGATGACACAGAATGAGCTGCGGCCAAGTGTATCTTCTTCTTGGCCGGTTTTGA	950
Gamb. CYP6P3	GACGTGTCACCACACAAAAGCTTCTGTCTGTACGAGCTGGCAAAGAACCCGGACATCCA	1010
Fun. CYP6P9	GACATCATCCACGACGCAAGCTTCTGTCTGTACGAGTTGGCAAAGAACCCGATGACATCCA	1010
CYP6M8	-----CTGTATGAACTGGCGCTGAACCCGGAAGTGCA	32
CYP6M7	-----CTGTATGAACTGGCGCTGAACCCGGAAGTGCA	32
CYP6AA4	-----CTGTATGAACTGGCGCAACCCGGATATTCA	32
Gamb. CYP6Z1	TACTTCCACGGTACGATTACATTCACTGCACGAGCTGCGCAACAATGCTGAGGCCAT	965
CYP6P2	GACGTCTCCACACTGTAACGTGAGCGCTGTACGAGCTAGCGCTGAACCCGAGGTGCA	1004
CYP6M1	AACGTCTCCACACTGTAACGTGAGCGCTGTACGAGCTAGCGCTGAACCCGAGGTGCA	977
Min. CYP6P7	AACGTCTCTACACGATGAACTTTTGTGTTGTACGAGCTGCGCAAGAATTCGAGCTGCA	1010
	* * * * *	
Gamb. CYP6P3	GGAGCGGCTGACAGAGAAATTAATCGAGTATTCCGGAGAACCGTGGAGAGTGACGTA	1070
Fun. CYP6P9	GGAGCGCCTTAGACAAGAGATCAACCAAGCAATCGAGGAGATGACGGCCAGGTGACGTA	1070
CYP6M8	GGAAAGGGCCGTAATGCGTGGCTGAAGTGTGAAAAAACAATAACGGCCGAAATGACGTA	92
CYP6M7	GGATAAAGCCGCTGTTGCGTGAAGAAGTGTGGAACGTCATAACGGCCGAAATGACGTA	92
CYP6AA4	GGAACTGTGCGTCCGGAAAGTGTGGAAGTGTGGAACGTCATAACGGCCGAAATGACGTA	92
Gamb. CYP6Z1	GGCTAAGCTTCAGCGAGAGGTTGATGAGATGATGAGCGACACACCGTGAATACACGTA	1025
CYP6P2	GGAGCGGTTGAGGGGGAAATTCGAGCGTCCGGTGGAGGAAACCGTGGCCAGGTGACGTA	1064
CYP6M1	GGAAAAGGGACGCCAGTGTGTGAGGAAAGTGTCCGCAAGCATAATGGGGAGATGACGTA	1037
Min. CYP6P7	GGAAAGGCTCCGGAAAGAAATTAACCGAGCGCTCGAGGCAATGGTGGGGAACGACGTA	1070
	* * * * *	

F CYP6AA4
 5'-AGGTGACACTATAGAATATCCCGGTC
 GGTAATATGAAA-3'

R
 5'-ACTTCATGCTTAAGCCGGTGTCCCT
 ATAGTGAGTCGTAC-3'


```

Gamb. CYP6P3      CTTCTCGCCGTCCGCGCGTACGCCCGAACGGGTAGAATACGATCCGAAAATGATAACCAT 1487
Fun.  CYP6P9      CTTCTCACCCTCAGCGCGTACACCAGATTGTGTAAGTTTCGATCCGAAAATGATCATTCT 1487
      CYP6M8      -----
      CYP6M7      -----
      CYP6AA4      -----
Gamb. CYP6Z1      CTTTTCGGCCACC-----ATTCCGAGGAAGATAAAAGTTTGAGCCCGTTTCAATCACACT 1433
      CYP6P2      ATTTTCGCCGACGGAGCAAACGCCGTGACCGTATCCGGTTTATGCCGAACGTGTTTGTGCT 1481
      CYP6M1      CTTTGCGCCGTACGAAAAAACTTCCATCCCGATGAAGTTCATTACGAAACAGTTTCATACT 1454
Min.  CYP6P7      ATTTTCACCACAGCGAAAACACCAGAAACGATCCGATTTATGCCGAACGTGTTTCACTCT 1487

Gamb. CYP6P3      AGCGCCGAAAAGCGGGCAACTACTTGAAGGTGAAAAGTTGTAG----- 1530
Fun.  CYP6P9      GTCACCGATCGCGGGTAATTACTTGAAGGTGAAAAGTTGTAG----- 1530
      CYP6M8      -----
      CYP6M7      -----
      CYP6AA4      -----
Gamb. CYP6Z1      GGCACCGAAAAGGAGGCCTTCCAATGAGGATCGAGAAATCGTGTTAAACATTAA----- 1485
      CYP6P2      GTCGCCGGACAGTGGGAACTATCTGGAGGTGGAGAAGCTTTGA----- 1524
      CYP6M1      GGGTCCGAGGAAGGCTTATGGTTGAAGGTGAACAAGCTGGAATCGAAGCAAGTTGA 1512
Min.  CYP6P7      ATCCCGGACAGGGGAACTATCTGCATGTGGAGAAGATATAG----- 1530

```


Glosario

1. ADN (ácido desoxiribonucleico): polinucleótido que tiene una secuencia específica de unidades de desoxiribonucleótidos unidos por enlaces covalentes fosfodiéster de 3'-5'. Sirve como información genética (Nelson, *et.al.* 2005).
2. Alineamiento de secuencias: forma de representar y comparar dos o más secuencias de proteína, ADN o ARN para determinar las regiones en común (Klug, *et.al.* 2005).
3. Annealing: unión por enlaces de hidrógeno de una secuencia de AND o ARN a una hebra complementaria (Klug, *et.al.* 2005).
4. ARN: polinucleótido que tiene una secuencia específica de unidades de ribonucleótidos unidos por enlaces covalentes fosfodiéster de 3'-5'. Sirve como información genética (Nelson, *et.al.* 2005).
5. Aumentador: sitio regulador del ADN que puede localizarse a distancia, sea corriente arriba o abajo del promotor regulador. La unión de uno o más factores transcripcionales a la secuencia aumentadora incrementa la velocidad de transcripción de un gen (Karp 2006).
6. Bases degeneradas: son una representación dada por la IUPAC para una posición en una secuencia de ADN que pueden ser diferentes nucleótidos (McNaughty *et.al.* 1997).
7. Cloroquina: droga utilizada para combatir la malaria en los humanos (CDC malaria glossary 2004).
8. Contenido GC: el número de Gs y Cs en el iniciador como porcentaje de la cantidad de bases totales. (Premier Biosoft International 2009).
9. Diptera: orden de insectos caracterizados porque sus alas posteriores se han reducido por lo que solo poseen dos alas membranosas y no cuatro como los otros insectos (Tree of life 2005).
10. Endopterygota: superorden de insectos con etapas bien definidas como larva, pupa y adulto. Endo = sin y pterygos = alas; esto significa que en las etapas inmaduras las futuras alas no son visibles, sino que está internalizadas, y aparecen en las últimas etapas como pupa (Tree of life 2005).

11. Esporozoito: estadio del ciclo de vida del parásito de la malaria. Estos son producido en el mosquito y migran a las glándulas salivales de este. Estos pueden ser inoculados directamente en el hospedero cuando el mosquito come (CDC malaria glossary 2004).
12. Esquizogonia: fase asexual reproductiva del parásito de la malaria. En los eritrocitos, la esquizogonia involucra el desarrollo de un solo trofozoito en numerosos merozoitos. Algo similar sucede en las células del hígado infectadas (CDC malaria glossary 2004).
13. Esquizonte: forma en desarrollo del parásito de la malaria que contiene muchos merozoitos. Estos se pueden observar durante la fase en el hígado y en la sangre (CDC malaria glossary 2004).
14. Estructura de lazo o hairpin: estructura formada debido a la interacción intramolecular dentro el iniciador. (Premier Biosoft International 2009).
15. Exflagelación: formación de microgametos flagelares en la desarrollo del parásito de la malaria (CDC malaria glossary 2004).
16. FAD (flavin adenina dinucleótido) coenzima de algunas enzimas de óxido-reducción, contiene riboflavina (Nelson, *et.al.* 2005).
17. Familia de genes: grupo de genes que son homólogos y bioquímicamente similares (Karp 2006).
18. Flavoproteína: enzima que contiene un nucleótido de flavina como grupo prostético. (Nelson, *et.al.* 2005).
19. Gametocito: célula eucariota que se divide por mitosis para genera gametocitos o por meiosis en gametos. Los gametocitos machos se llaman espermatocitos y los femeninos ooquistes (CDC malaria glossary 2004).
20. Gametogonia: células que se dividen en gametocitos durante la gametogénesis (CDC malaria glossary 2004).
21. Gen: segmento del cromosoma que codifica para un solo polipéptido funcional o para una molécula de ARN (Nelson, *et.al.* 2005).
22. Género: categoría de clasificación de un grupo de especies relacionadas en estructura y origen evolutivo. En la clasificación se encuentra debajo de la familia y por encima de la especie (Tree of life 2005).

23. Hélice alfa: estructura secundaria de un polipéptido en la cual el esqueleto de la cadena forma una conformación espiral en hélice (Karp 2006).
24. Hemoproteína: proteína que contiene como grupo prostético el anillo de hierro-porfirina (Nelson, *et.al.* 2005).
25. Heterodímero: estructura formada por interacciones intramoleculares entre los iniciadores forward y reverse cuando son homólogos. (Premier Biosoft International 2009).
26. Hoja beta plegada: estructura secundaria posible de un polipéptido en la cual diferentes cadenas beta están dispuestas de forma paralela y crean una conformación de hoja (Karp 2006).
27. Homodímero: estructura formada por las interacciones intramoleculares entre dos iniciadores con el mismo sentido. (Premier Biosoft International 2009).
28. *In silico*: hecho por computadora o via simulación en computadora (Merriam-Webster 2009)
29. Infraorden: categoría taxonómica inmediatamente inferior al del *suborden* y superior al de *familia* o *superfamilia* (Tree of life 2005)
30. Iniciador degenerado: Son iniciadores diseñados por lo general a partir de una secuencia de proteína de un organismo para amplificar genes en otros organismos que puede tener una secuencia parecida. Debido a que pueden haber codones diferentes para un aminoácido, se utilizan las bases degeneradas las cuales pueden representar diferentes nucleótidos (Klug, *et.al.* 2005).
31. Iniciador forward: oligonucleótido que se lee de 5' a 3' como la hebra molde y se une en la región 5' de ésta (Klug, *et.al.* 2005).
32. Iniciador reverse oligonucleótido que se une a la región 3' de la hebra molde (Klug, *et.al.* 2005).
33. Iniciador: cadena de ADN que provee a la polimerasa de ADN el 3' OH terminal necesario (Karp 2006).
34. Inosina: nucleósido intermediario de las rutas de síntesis de ácidos nucleicos que se forma cuando la hipoxantina se une a un anillo de ribosa (Klug 2006).
35. Insecta: clase de invertebrados del filo de artrópodos (Tree of life 2005).

36. Isoformas: múltiples formas de una enzima que catalizan la misma reacción pero difieren en la secuencia de aminoácidos y la afinidad por el sustrato (Nelson, *et.al.* 2005).
37. Lepidoptera: orden de insectos que contiene a las mariposas y polillas. El estado juvenil de este orden se conoce como oruga (Tree of life 2005).
38. Macrogametocito: gameto femenino del mosquito vector de la malaria (CDC malaria glossary 2004).
39. mARN: tipo de ARN complementario a las hebras de ADN, lleva el mensaje genético del cromosoma a los ribosomas (Nelson, *et.al.* 2005).
40. Metabolito: intermediario químico en las reacciones catalizadas por enzimas en el metabolismo (Nelson, *et.al.* 2005).
41. Microgametocito: gameto masculino del mosquito vector de la malaria (CDC malaria glossary 2004).
42. Monofagia: Alimentarse de un solo tipo de comida, o de un solo animal o planta (Merriam-Webster 2009)
43. NADPH (nicotinamida adenin dinucleótido): coenzimas con nicotinamida funcionan como acarreadores de átomos de hidrógeno y electrones en algunas reacciones de óxido-reducción (Nelson, *et.al.* 2005).
44. Neoptera: infraclase de insectos que tienen como característica principal el plegamiento de las alas sobre el abdomen (Tree of life 2005).
45. Nucleósido: compuesto formado por una base purina o pirimidina unida covalentemente a una pentosa (Nelson, *et.al.* 2005).
46. Nucleótido: un nucleosido fosforilado en uno de los grupos hidroxilo de la pentosa (Nelson, *et.al.* 2005).
47. Ookinete: cigoto de algunos protozoarios como el parásito de la malaria (CDC malaria glossary 2004).
48. Ooquiste: estadio del ciclo de vida del parasite de la malaria. Son quistes redondos localizados en la pared exterior del estómago de los mosquitos. Los esporozoitos se

desarrollan dentro de la ooquiste. Cuando maduran, se rompe y se liberan los esporozoitos que luego migran a las glándulas salivales del mosquito (CDC malaria glossary 2004).

49. Orden: grupo por debajo del reino, filo y clase y por encima de familia, género y especie. Los miembros de esta categoría comparten ciertas características que indican un mismo origen evolutivo y que los diferencian de otros órdenes (Tree of life 2005).
50. Ovipostura: acción de poner huevos (Merriam-Webster 2009).
51. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): técnica en la cual una sola región del ADN, que puede estar presente en diferentes cantidades, puede amplificarse con precisión y rapidez (Karp 2006).
52. Pirimidina: una clase de base nitrogenada hallada en los nucleótidos con una estructura de anillo único, con una citosina y timidina, las cuales se encuentran en el ADN, y citosina y uracilo que se encuentran en el ARN (Karp 2006).
53. Polifagia: alimentarse de diferentes tipos de alimentos (Merriam-Webster 2009)
54. Primaquina: droga utilizada para combatir la malaria en los humanos (CDC malaria glossary 2004).
55. Proboscis: apéndice elongada que sale de la cabeza del animal vertebrado o invertebrado. Los insectos la utilizan para alimentarse (CDC malaria glossary 2004).
56. Proteína: macromolécula compuesta de uno o más cadenas de polipéptidos cada una con una secuencia de aminoácidos característica (Nelson, *et.al.* 2005).
57. Pterygota: subclase de insectos cuya característica principal son las venas en las alas y en el segundo y tercer segmento torácico (Tree of life 2005).
58. Purina: clase de base nitrogenada encontrado e los nucleótidos con estructura de doble anillo, incluidas adenina y guanina, que se encuentran en el ADN y ARN (Karp 2006)
59. Regiones consenso: regiones común pero no necesariamente idéntica en una secuencia de ADN o proteína (Klug, *et.al.* 2005).
60. Residuos de aminoácidos: cuando dos o más aminoácidos se combinan para formar un péptido, se remueve el agua en cada uno y lo que queda del aminoácido es el residuo (McNaughty 1997).

61. Retrotransposón: elemento transponibles que requieren la transcriptasa inversa para sus movimientos (Klug, *et.al.* 2005).
62. Secuencias conservadas: secuencias de aminoácidos de polipéptidos particulares o las secuencias de ácidos nucleares específicos. Si dos secuencias son similares, por ejemplo homólogas, se dice que están conservadas y que tiene un ancestro en común (Karp 2006).
63. Secuencias homólogas: cuando las secuencias de aminoácidos de dos o más polipéptidos o las secuencias nucleotídicas de dos o más genes, son similares entre ellas, se presume que han evolucionado a partir de una misma secuencia ancestral (Nelson, *et.al.* 2005).
64. Sitio cis regulatorio o Elemento cis regulatorio: region del AND o ARN que regula la expression de los genes y está localizada en la misma hebra (Klug, *et.al.* 2005).
65. Sitio tras regulatorio o Elemento trans regulatorio: factores, usualmente proteínas, que se unen a sitios cis regulatorios para controlar la expresión de genes (Klug, *et.al.* 2005).
66. Superorden: subdivisión entre el orden y la clase de la clasificación de una planta o animal (Tree of life 2005).
67. Tm o primer melting temperature: temperatura a la cual 50% de las moléculas del oligonucleótido esta 50% como simple hebra y 50% como doble hebra. (Premier Biosoft International 2009).
68. Trofozoito: forma en desarrollo durante la fase eritrocitaria del parásito de la malaria. Después se desarrollan en trofozoitos y luego en esquizontes (CDC malaria glossary 2004).
69. Vector: un cargador que transmite agentes infecciosos de un hospedero a otro (CDC malaria glossary 2004).
70. ΔG : la energía libre de Gibbs G es la medicion de la cantidad de trabajo que puede ser extraído de un proceso a presión constante. Es la medición de la espontaneidad de la reacción. Valores negativos más pequeños de ΔG indican que las estructuras secundarias de los iniciadores son más estables (Premier Biosoft International 2009).