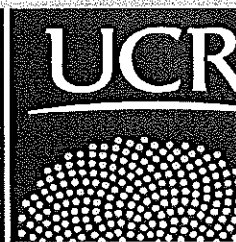


REVISTA DE  
**BIOLOGÍA TROPICAL**  
INTERNATIONAL JOURNAL OF TROPICAL BIOLOGY AND CONSERVATION  
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA - VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN



11 de mayo de 2015  
RBT-142-2015

UCR FM 11:55 12/05/15

Señor  
Dr. Luis Bernardo Villalobos Solano  
Decano de Medicina  
Universidad de Costa Rica

Estimado señor Decano:

Cada dos años la *Revista de Biología Tropical* otorga el **Premio Familia Girolami**, por un monto de \$2000, a los autores del mejor artículo en el área de la biomedicina.

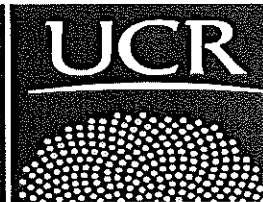
El contrato vigente especifica que el artículo ganador debe ser elegido por un jurado designado por los Decanos de Microbiología, Medicina y Farmacia, y por el Director de la Escuela de Biología.

Por lo anterior, muy respetuosamente le solicitamos su apoyo para que los documentos adjuntos sean debidamente evaluados por una persona de su elección. Cuando se anuncie el premio, se dará el debido reconocimiento a ustedes.

Cordialmente:

  
Julián Monge-Nájera  
Director





## Premio Familia Girolami

### Formulario de Evaluación

La *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation* otorga bienalmente el Premio Familia de Girolami a un artículo de origen costarricense publicado en sus páginas en el campo biomédico. Este año únicamente participan en el concurso los artículos adjuntos, seleccionados exclusivamente por cumplir los requisitos de tema y origen.

La identidad de quienes califican los artículos es confidencial y agradeceremos mucho su ayuda para otorgar el Premio Familia de Girolami 2015.

Artículo	Calificación (1 mínima, 10 máxima)
Actividad contra <i>Leishmania</i> sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de plantas en una Reserva Biológica de Costa Rica	
Ethnic background and CYP2D6 genetic polymorphisms in Costa Ricans	
Comentarios:	

Evaluador(a): \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Le agradeceremos devolver en sobre sellado antes del 30 de mayo 2015 a:

Julián Monge – Nájera

Director

Revista de Biología Tropical, frente Facultad de Bellas Artes, Ciudad Universitaria

## Actividad contra *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de plantas en una Reserva Biológica de Costa Rica

Misael Chinchilla-Carmona<sup>1</sup>, Idalia Valerio-Campos<sup>1</sup>, Ronald Sánchez-Porras<sup>2</sup>, Vanessa Bagnarello-Madrigal<sup>1</sup>, Laura Martínez-Esquivel<sup>1</sup>, Antonieta González-Paniagua<sup>2</sup>, Javier Alpizar-Cordero<sup>1</sup>, Maribel Cordero-Villalobos<sup>1</sup> & Daniela Rodríguez-Chaves<sup>1</sup>

1. Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), San José, Costa Rica; chinchillaacm@ucimed.com, valeriaci@ucimed.com, bagnarellomy@ucimed.com, martinezcl@ucimed.com, alpizarcj@ucimed.com, corderomv@ucimed.com, danirodrigu@gmail.com
2. Universidad de Costa Rica, Sede Occidente, Sección de Biología, San José, Costa Rica; rsanchez@cariari.ucr.ac.cr, agpaniagua@gmail.com

Recibido 22-XI-2013. Corregido 10-II-2014. Aceptado 13-III-2014.

**Abstract: Anti-leishmanial activity in plants from a Biological Reserve of Costa Rica.** Leishmaniasis is an important human disease very difficult to treat. For this reason, many researchers in the world have been looking for anti-leishmanial chemical components present in several plant species. In Costa Rica, since no studies have been done in this field, this work aimed at the search of active chemical components in local plants that may have an activity against *Leishmania* sp. A total of 67 plants were selected from the Alberto Manuel Brenes Biological Reserve (REBAMB). For these collected plants, fresh or dried hidroalcoholic extracts of root, stem, mature or young leaves, flowers, and immature or mature fruits, were prepared under conventional methods. All extracts were tested for their effect against a strain of *Leishmania* (OCR with known characteristics). Firstly, by presumptive tests, we selected only those with some activity, and then, more specific studies were done to determine the  $IC_{50}$  in  $\mu\text{g/mL}$ ; a promising plant was considered only if at least one of its parts presented an  $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ . Under this parameter, the following active plants were obtained and their lowest and highest  $IC_{50}$  obtained values presented ( $\mu\text{g/mL}$ ): *Bocconia frutescens* (0.6 and 66.7), *Clematis dioica* (27.5 and 44.4), *Cordia megalantha* (80.0), *Eugenia austini-smithi* (90.6), *Guarea bullata* (98.8), *Guateria tonduzii* (44.4 and 66.3), *Mikania holwayana* (45.0 and 95.6), *Nectandra membranacea* (44.5 and 58.6), *Neurolaena lobata* (25.0 and 100.0), *Persea povedae* (76.9), *Piper auritum* (60.0), *Rollinia pittieri* (43.1), *Solanum arboreum* (25.8 and 72.5), *Tetrorchidium eurphyllum* (53.8 and 95.0), *Witheringia solanacea* (15.9 and 98.1) and *Zanthoxylum juniperinum* (23.4 and 97.5). Although the parasitic effect of fresh or dried extracts were almost similar, the fresh material slightly showed better results. That anti-parasitic effect occurred in one or more than four parts of the plant. Most of the active extracts did not produce lysis and agglutination which indicates a low toxicity. Since the species studied are different from those analyzed by other authors, we discuss the importance of these new findings, in relation to the new scientific knowledge, and the possible use of these plants as a leishmaniasis treatment. Rev. Biol. Trop. 62 (3): 1229-1240. Epub 2014 September 01.

**Key words:** leishmaniasis, *Leishmania*, medicinal plants, *in vitro*, Costa Rica.

La leishmaniasis es una entidad parasitaria compleja por el número de especies involucradas que dependen de la ubicación geográfica de las mismas, la localización corpórea en el ser humano, la patología causada, todo ello afectado por aspectos muy diversos de tipo epidemiológico e inmunológico, ampliamente

estudiados pero aún no totalmente resueltos (Dawit, Girma, & Simenew, 2012; Strazzulla et al., 2013). Esta misma diversidad se refleja también en las dificultades que se presentan en su tratamiento, tanto en relación con el tipo de fármacos usados como en la dosificación de los mismos (Lindoso, Costa, Queiroz, &

Goto, 2012). Su importancia médica es ampliamente conocida en las zonas tropicales del mundo, especialmente en su manifestación visceral, que ha causado y sigue ocasionando un número importante de muertes, especialmente cuando está asociada al virus del SIDA (Alexandrino-de-Oliveira et al., 2010). Los tipos de leishmaniosis cutáneos usualmente no causan la muerte, pero sus manifestaciones ulcerosas, no solo son estéticamente inconvenientes, sino dolorosas y proclives a infecciones secundarias bacterianas. En Costa Rica, este tipo es el más frecuente y el que ha sido más estudiado especialmente desde un punto de vista epidemiológico y de casuística humana. La revisión realizada por Jaramillo-Antillón, Espinoza-Aguirre, y Lobo-Philip (2009) es prolífica en información sobre lo conocido en este país sobre esta parasitosis. En cuanto a la leishmaniosis visceral, existe el reporte perfectamente documentado de un primer caso en Liberia, Guanacaste (Carrillo, Chinchilla, Valverde, Porras, & Mora, 1999), además de otro caso en la misma zona, cuyo diagnóstico parasitológico se hizo en su oportunidad pero no ha sido publicado. Estos hallazgos son de gran importancia y establecen una alerta, ya que como se indicó anteriormente, este tipo de leishmaniosis si puede causar la muerte.

De acuerdo con lo anterior y del hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a esta enfermedad dentro de las prioritarias en el contexto mundial (WHO, 2010), los estudios sobre el tratamiento de la misma siguen siendo motivo de discusión. La razón de estos análisis emergen del hecho de que las principales drogas usadas son antimoniales de conocido efecto negativo en la función hepática, y en muchos casos las dosis necesarias para la cura completa son muy altas (Lindoso et al., 2012). Surgen entonces en el mundo diversos estudios buscando componentes activos naturales que resulten, eventualmente, con una actividad antiparasitaria similar, pero menos tóxicos (Rocha, Almeida, Macedo, & Barboza-Filho, 2005; Castillo, González-Resende, Dea, & Galiana, 2011; Brito, dos Santos, Rodríguez, Brito, & Xavier-Filho, 2013). Se conocen

trabajos en diversos países del Viejo Continente (Githinji et al., 2010; Mwangi et al., 2010; Bero, Hannaert, Chataigné, Hérent, & Quetin-Leclercq, 2011; Fattahi, Reza, Hossein, Barzegar, & Ghafourzadeh, 2011; Kakar et al., 2013), América del Sur (Luize et al., 2005; Peixoto et al., 2011; De Lima et al., 2012; Cechinel et al., 2013) así como en Centroamérica y el Caribe (Fernández-Calienes et al., 2008; García, Monzote, Scull, & Herrera, 2012). En Costa Rica, aunque existen algunos estudios de componentes antiparasitarios en plantas (Castro, Barrios, Chinchilla, & Guerrero, 1996; Chinchilla, Guerrero, Abarca, Barrios, & Castro, 1998; Chinchilla, Guerrero, Tamayo, & Sittenfeld, 2001; Calderón et al., 2010; Chinchilla et al., 2011, 2012), muy pocos de ellos se han realizado en relación con la leishmaniosis. Dada la riqueza de la biodiversidad costarricense y al encontrar en la literatura que contamos con especies de plantas de géneros en las que se han detectado componentes anti-*Leishmania*, se decidió seleccionar algunas de esas especies presentes en la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB), y realizar en ellas, los correspondientes análisis que dan origen al presente estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Plantas:** Diferentes partes de 67 especies de plantas seleccionadas previamente (Cuadro 1), de acuerdo con la posible actividad antiparasitaria contra *Leishmania* sp., fueron obtenidas de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB). Las características ambientales en donde se ubica esta Reserva han sido ampliamente descritas en trabajos previos, pero en términos generales se trata de una zona ubicada entre los 600 y 1 640m de altura, con una temperatura promedio de 21°C y una humedad relativa del 98%, todo lo cual incide en la presencia de variados climas y nichos ecológicos (Sánchez, 2000). La recolecta del material se realizó apoyándonos en las publicaciones de Barrantes (2004) y Gomez-Laurito y Ortiz (2004) y de acuerdo con metodología previamente descrita (Chinchilla et al.,

CUADRO 1  
Plantas de la REBAMB estudiadas por su actividad contra *Leishmania* sp.

TABLE 1  
Plants from REBAMB studied for the anti-leishmanial activity

Familia	Especie	Actividad	Partes activas
Acantaceae	<i>Aphelandra aurantiaca</i>	Negativa	Ninguna
Acantaceae	<i>Aphelandra tridentata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Beilschmieda pendula</i>	Negativa	Ninguna
Papaveraceae	<i>Bocconia frutescens</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Cecropiaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i>	Promisoria	F
Cecropiaceae	<i>Cecropia peltata</i>	Promisoria	HT
Meliaceae	<i>Cedrela odorata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Cinnamomum chavarrianum</i>	Promisoria	FI-HM-HT
Ranunculaceae	<i>Clematis dioica</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Boraginaceae	<i>Cordia cymosa</i>	Promisoria	HT
Boraginaceae	<i>Cordia megalantha</i>	Promisoria	C-HM-R
Euphorbiaceae	<i>Croton megistocarpus</i>	Promisoria	HM-HT
Euphorbiaceae	<i>Croton schiedeanus</i>	Negativa	Ninguna
Sapindaceae	<i>Cupania macrophylla</i>	Negativa	Ninguna
Myrtaceae	<i>Eugenia austin-smithii</i>	Promisoria	C
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	Promisoria	C-HM-HT
Arecaceae	<i>Euterpe precatoria</i>	Negativa	Ninguna
Meliaceae	<i>Guarea bullata</i>	Promisoria	FM-HM
Meliaceae	<i>Guarea glabra</i>	Promisoria	FI
Meliaceae	<i>Guarea kunthiana</i>	Promisoria	HM
Meliaceae	<i>Guarea rhopalocarpa</i>	Promisoria	FM
Annonaceae	<i>Guatteria tonduzii</i>	Promisoria	C-FI-HM-R
Malvaceae	<i>Hampea appendiculata</i>	Negativa	Ninguna
Tiliaceae	<i>Heliocarpus appendiculatus</i>	Promisoria	C
Hernandiaceae	<i>Hernandia stenura</i>	Negativa	Ninguna
Campanulaceae	<i>Hippobroma longiflora</i>	Promisoria	FI
Apiaceae	<i>Hydrocotyle mexicana</i>	Promisoria	C-R
Arecaceae	<i>Iriarteia deltoidea</i>	Promisoria	F-HM-HT
Caricaceae	<i>Jacaratia spinosa</i>	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Liabum bourgeau</i>	Promisoria	F-HT
Fabaceae	<i>Lonchocarpus pentaphyllus</i>	Promisoria	F-FI-FM
Fabaceae	<i>Macaerium</i> sp.	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Mikania hohwayana</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Urticaceae	<i>Myriocarpa longipes</i>	Promisoria	HT-R
Lauraceae	<i>Nectandra membranacea</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Asteraceae	<i>Neurolaena lobata</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Lauraceae	<i>Ocotea dentata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Persea povedae</i>	Promisoria	FM
Piperaceae	<i>Piper auritum</i>	Promisoria	F-FI-FM-HM-HT
Piperaceae	<i>Piper friedrichsthalii</i>	Negativa	Ninguna
Sapotaceae	<i>Pouteria congestifolia</i>	Promisoria	F
Lauraceae	<i>Povedadaphne quadriporata</i>	Negativa	Ninguna
Rosaceae	<i>Prunus annularis</i>	Negativa	Ninguna

CUADRO 1 (Continuación) / TABLE 1 (Continued)

Familia	Especie	Actividad	Partes activas
Mirtaceae	<i>Psidium guajava</i>	Promisoria	C-HM
Rubiaceae	<i>Psychotria elata</i>	Promisoria	F-FM-HM-HT
Fabaceae	<i>Pterocarpus hayesii</i>	Promisoria	HT
Fagaceae	<i>Quercus cortesii</i>	Promisoria	HT-R
Fagaceae	<i>Quercus insignis</i>	Promisoria	FI
Annonaceae	<i>Rollinia pittier</i>	Promisoria	FI
Meliaceae	<i>Ruarea glabra</i>	Promisoria	FI-FM
Anathaceae	<i>Ruellia tubiflora</i>	Promisoria	HM
Caprifoliaceae	<i>Sambucus canadensis</i>	Promisoria	C
Caesalpiniaceae	<i>Senna papillosa</i>	Promisoria	FI
Siparunaceae	<i>Siparuna thecaphora</i>	Promisoria	FI
Solanaceae	<i>Solanum arboreum</i>	Promisoria	F-FI-FM-R
Solanaceae	<i>Solanum quitoense</i>	Negativa	Ninguna
Bignoniaceae	<i>Tabebuia chrysantha</i>	Promisoria	C
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana longipes</i>	Negativa	Ninguna
Anacardiaceae	<i>Tapiriria mexicana</i>	Negativa	Ninguna
Euphorbiaceae	<i>Tetrorchidium euryphyllum</i>	Promisoria	C-F-FM-HT
Ticodendraceae	<i>Ticodendron incognitum</i>	Negativa	Ninguna
Urticaceae	<i>Urera baccifera</i>	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Vernonia patens</i>	Promisoria	F-HT
Clusiaceae	<i>Vismia baccifera</i>	Promisoria	C-FI-HT
Solanaceae	<i>Witheringia solanacea</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Araceae	<i>Xanthosoma undipes</i>	Promisoria	FI
Rutaceae	<i>Zanthoxylum juniperinum</i>	Promisoria	R

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz.

2011, 2012). En síntesis, corteza, flores, hojas maduras y tiernas, así como frutos maduros e inmaduros y raíz, fueron recolectadas en bolsas plásticas que se depositaron en un recipiente con hielo para su transporte al Laboratorio de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED) en donde fue procesado todo el material.

**Preparación de los extractos:** Todas las partes de las plantas fueron lavadas cuidadosamente y trituradas finamente. Una porción fue usada inmediatamente constituyendo el material fresco de estudio, y otra porción fue sometida a secado y convertida en polvo fino; este material se calificó como seco para todos los efectos del estudio. Para realizar un análisis presuntivo general, se usaron 15g de material fresco o seco el cual fue colocado en frascos ámbar de 250mL para la correspondiente

extracción con 100mL de etanol al 70% por una semana, a temperatura ambiente con agitación ocasional. Estos extractos hidroalcohólicos fueron filtrados al vacío usando un embudo Büchner con papel Whatmann1 y luego concentrados a 40°C con un rotavapor (Buchi R-114); con este procedimiento se eliminó totalmente el alcohol.

**Parásitos:** Promastigotos de la cepa OCR (gentilmente cedida por el Dr. Rodrigo Zeledón) fueron cultivados en medio de Rugai para el mantenimiento de la cepa y específicamente para los experimentos, en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, ambos medios ampliamente conocidos.

**Ensayos *in vitro*:** Para hacer una selección previa de las plantas promisorias en cuanto a la actividad contra *Leishmania*, extractos crudos

frescos o secos de las diferentes partes de cada planta fueron diluidos 1:20 en solución salina buferizada (PBS) con adición de DMSO al 10% cuando fue necesario, y mezclados con aproximadamente  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  promastigotos. Estas muestras más los respectivos controles negativo (sin extracto) y positivo (incluyendo parásitos muertos por calor), fueron colocados a 4°C por 24 horas (Vieira et al., 2001), después de lo cual la viabilidad de los parásitos fue determinada por medio del azul tripano, técnica ampliamente conocida. La actividad antiparasitaria fue determinada estableciendo como parámetro la presencia de más del 50% de promastigotos teñidos.

Aquellos extractos positivos en esta primera prueba fueron sometidos a una segunda de confirmación de potencia del efecto. Para ello se prepararon diluciones dobles de 1:20 a 1:160 de cada extracto promisorio, se agregaron los promastigotos y se procedió con el método antes indicado. Aquellos extractos cuya viabilidad fue menor del 50% en diluciones de 1:80 en adelante, fueron considerados como positivos para el correspondiente seguimiento. Este consistió en las pruebas para determinar la concentración mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) del producto activo, capaz de producir la disminución de movimiento o muerte del 50% de los organismos ( $\text{CI}_{50}$ ). Para obtener este índice se realizaron diluciones seriadas del extracto de acuerdo con el peso seco previamente establecido en cada caso, procediendo luego al proceso de refrigeración por 24h y la lectura de la viabilidad de los parásitos.

**Pruebas de toxicidad:** Para este análisis se determinaron los efectos lítico y aglutinante de los extractos seleccionados según las pruebas anteriores y de acuerdo con el procedimiento descrito por Luize et al., (2005) con ligeras modificaciones. Brevemente, a 50 $\mu\text{L}$  del extracto en diluciones de 1:20 a 1:640 se les agregó 50 $\mu\text{L}$  de sangre de ratón heparinizada (heparina sódica para inyección FB 5 000 U.I./ $\mu\text{L}$ . Rotex Médica, lote 30085) en una concentración del 3%. Después de permanecer 24h a 4°C, las placas con las mezclas indicadas

fueron leídas cualitativamente observando el efecto de lisis o aglutinación globular; se consideraron tóxicos aquellos extractos que presentaron esos efectos en diluciones arriba de 1:80.

El método de Probit (Díaz, Bulus, & Pica, 2004) fue usado especialmente para el cálculo de  $\text{CI}_{50}$  de la actividad antiparasitaria encontrada.

## RESULTADOS

De las 67 plantas estudiadas, 47 presentaron una actividad promisorio en los análisis presuntivos iniciales (Cuadro 1). Al realizar una selección de las plantas realmente positivas por su actividad en la dilución de al menos 1:80 en algunas de sus partes, la actividad se mantuvo en casi todas ellas con la única excepción de *Rollinia pittieri*, planta que en conjunto con las consideradas negativas previamente, fueron descartadas para la realización de análisis posteriores. El cuadro 2 indica las partes de las plantas que presentaron una actividad contra *Leishmania* sp. en diluciones de 1:80 y 1:160. Como se puede observar, diferentes partes de esas plantas resultaron activas, tanto para los extractos frescos como para aquellos sometidos a desecación. Estos datos nos garantizaban una actividad medible, la cual se presenta en el cuadro 3, en donde se muestran los valores de  $\text{CI}_{50}$  para un total de 16 plantas que fueron las que evidenciaron valores menores a 100 $\mu\text{g/mL}$ , concentración límite de actividad aceptada como importante por varios autores (Kakar et al., 2013). Se destaca la *B. frutescens* como la planta con valores de  $\text{CI}_{50}$  más bajos, lo que denota una importante actividad. Otras plantas como *C. dioica*, *M. holwayana*, *N. lobata*, *S. arboreum*, *W. solanaceae* y *Z. juniperinum* mostraron en algunas de sus partes una actividad notoria.

En el cuadro 4 se hace un análisis del tipo de extracto (fresco, seco o ambos) que mostraron resultados positivos para cada una de las partes de las plantas promisorias. Aunque el número de extractos frescos activos fue ligeramente mayor, realmente no hubo diferencias con los extractos que fueron positivos después de la desecación o en ambas condiciones, frescos y

CUADRO 2  
Actividad de varias partes de plantas de la REBAMB sobre promastigotos de *Leishmania* sp.

TABLE 2  
Anti-*Leishmania* activity of several parts of plants from REBAMB

Familia	Género	Actividad antiparasitaria (Dilución positiva 1/80, 1/160)															
		C		FL		FI		FM		HM		HT		R			
		F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S		
Papaveraceae	<i>B. frutescens</i>	160	160	160	160	160	160	160	160		160	160	160	160	160		
Cecropiaceae	<i>C. peltata</i>											160	160				
Lauraceae	<i>C. chavarrianum</i>					160				80		80					
Ranunculaceae	<i>C. dioica</i>	160		80	80	80	80	80	80	80	160	80		160			
Boraginaceae	<i>C. cymosa</i>												160				
Boraginaceae	<i>C. megalantha</i>		160							160						160	
Euphorbiaceae	<i>C. megistocarpus</i>		160							160		160					
Myrtaceae	<i>E. austin-smithii</i>	160															
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	160						160		160	160	160					
Meliaceae	<i>G. bullata</i>							160		160		160					
Meliaceae	<i>G. glabra</i>							160									
Meliaceae	<i>G. kunthiana</i>									160							
Meliaceae	<i>G. rhopalocarpa</i>							160									
Annonaceae	<i>G. tonduzii</i>	160		80	160		80	80		80						160	
Tiliaceae	<i>H. appendiculatus</i>		160														
Campanulaceae	<i>H. longiflora</i>					160											
Apiaceae	<i>H. mexicana</i>		160													160	
Arecaceae	<i>I. deltoidea</i>			80	160						160	80					
Asteraceae	<i>L. bourgeaui</i>			160								160	160				
Fabaceae	<i>L. pentaphyllus</i>				160	80		160	80								
Asteraceae	<i>M. holwayana</i>	160	160	160	160						160	160	160	160	160	160	
Urticaceae	<i>M. longipes</i>													160	80		
Lauraceae	<i>N. membranacea</i>		160		160		160		160	160	160	160	160	160	80		
Asteraceae	<i>N. lobata</i>		80	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	80	160	
Lauraceae	<i>P. povedae</i>						160	160									
Piperaceae	<i>P. aurinum</i>				160				160		160		160				
Piperaceae	<i>P. friedrichsthalii</i>															160	
Mirtaceae	<i>P. guajava</i>	160							80	160							
Fabaceae	<i>P. hayesii</i>												160				
Rubiaceae	<i>P. elata</i>		80				160				80						
Fagaceae	<i>Q. cortesi</i>	160											160		160		
Fagaceae	<i>Q. insignis</i>						80										
Caprifoliaceae	<i>S. canadensis</i>	160															
Anonaceae	<i>Rollinia pittier</i>				160												
Meliaceae	<i>R. glabra</i>						160		80								
Acanthaceae	<i>R. tubiflora</i>										160						
Caesalpinaceae	<i>S. papillosa</i>						160										
Siparunaceae	<i>S. thecaphora</i>						160										
Solanaceae	<i>S. arboreum</i>				160	160		160	160		160					160	
Bignoniaceae	<i>T. chrysantha</i>		160													160	
Euphorbiaceae	<i>T. euryphyllum</i>		160						160								
Clusiaceae	<i>W. baccifera</i>		160			160	160							160			
Solanaceae	<i>W. solanacea</i>	160	160	160	160	160			160		160	160	160			160	
Araceae	<i>X. undipes</i>					160											
Rutaceae	<i>Z. juniperinum</i>	160														160	

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz.



CUADRO 3  
Concentración mínima inhibitoria anti-*Leishmania* sp. (CI<sub>50</sub>, µg/mL) de los extractos frescos (F)  
y secos (S) de las partes positivas de plantas de la REBAMB

TABLE 3  
Minimal inhibitory concentration anti-*Leishmania* sp. (IC<sub>50</sub>, µg/mL) of the fresh (F)  
and dry (S) extracts of the positive parts of plants from REBAMB

Especie	Parte de la planta													
	C		FL		FI		FM		HM		HT		R	
	F	S	F	S	f	s	F	S	F	S	F	S	F	S
<i>B. frutescens</i>	9.7	2.8	56.9	38.1	7.5	12.5	6.3	6.4		66.7	30.3	10.8	0.6	3.5
<i>C. dioica</i>	44.4												27.5	
<i>C. megalantha</i>		80.0												
<i>E. austin-smithii</i>	90.6													
<i>G. bullata</i>							98.8							
<i>G. tonduzii</i>		53.8				66.3								44.4
<i>M. holwayana</i>	45.0	53.1	65.6								49.2		95.6	
<i>N. membranacea</i>									44.5		58.6			
<i>N. lobata</i>	81.3	100.0			52.8		25.0	46.4	79.4					
<i>P. povedae</i>								76.9						
<i>P. auritum</i>										60.0*				
<i>R. pittieri</i>				43.1										
<i>S. arboreum</i>				53.2		72.5	56.3	72.5						25.8
<i>T. euryphyllum</i>		53.8					95				93.8			
<i>W. solanacea</i>	15.9		76.9		98.1						34.1	82.5		96.3
<i>Z. juniperinum</i>	23.4													97.5

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz, F:fresco, s:seco.

CUADRO 4  
Distribución de los extractos positivos (CI<sub>50</sub><100µg/mL) según parte de la planta y tipo de extracto

TABLE 4  
Distribution of the positive extracts (IC<sub>50</sub><100µg/mL) according to part of the plant and extract type

Tipo de extracto	Partes de la planta															
	C		F		FI		FM		HM		HT		R		TOTAL	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Fresco solo	4	23.5	2	11.8	2	11.8	2	11.8	2	11.8	3	17.6	2	11.8	17	41.5
Seco solo	3	21.3	2	14.3	2	14.3	1	7.1	1	7.1	0	0	4	28.6	14	34.1
Fresco y seco	3	30.0	1	10.0	1	10.0	3	30.0	0	0.0	2	20.0	1	10.0	10	24.3
TOTAL	10	24.4	5	12.2	5	12.2	6	14.6	3	7.3	5	12.2	7	17.1	41	100.0

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz.

secos. En la figura 1 se establece el número y el correspondiente porcentaje de plantas con 1, 2, 3, 4 y más de 4 partes positivas. Por la importancia que tiene el efecto tóxico que pueden

presentar las plantas con acción antiparasitaria, en el cuadro 5 se muestra el grado de actividad lítica y aglutinante de cada uno de los extractos positivos. Cabe destacar que de acuerdo con

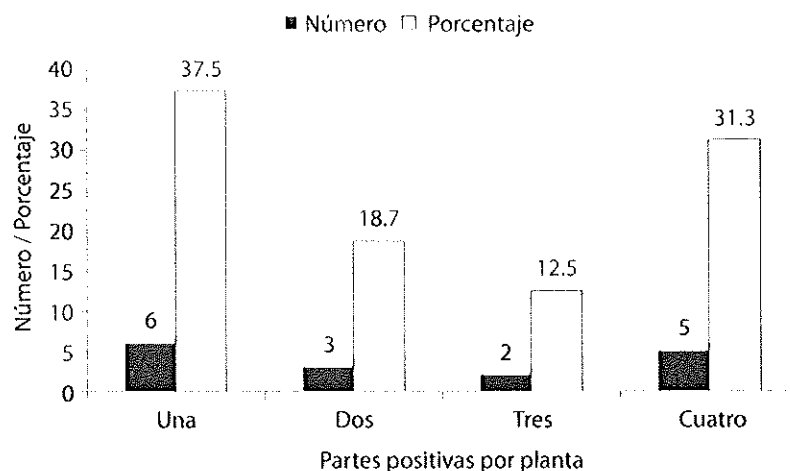


Fig. 1. Distribución de las plantas de acuerdo con el número de sus partes activas contra *Leishmania* sp.  
Fig. 1. Distribution of the plants according to the number of active parts against *Leishmania* sp.

#### CUADRO 5

Relación entre la toxicidad máxima *in vitro* (diluciones 1:80, 1:160) y la actividad contra *Leishmania* sp. de las partes positivas de plantas de la REBAMB

TABLE 5

Relation between the maximum *in vitro* toxicity (dilutions 1:80, 1:160) and the anti-*Leishmania* sp. activity of the positive parts from plants from REBAMB

Especie	Actividad Lítica o Aglutinante				Ausente
	Ligera		Intensa		
	1:80	1:160	1:80	1:160	
<i>B. frutescens</i>	FFs	Fls			C,F, FI,FM, HT, R, FMs, HM's, HT's. Rs
<i>C. dioica</i>					C, F, FI, FM, R, Fs, Fls, HM's
<i>C. megalantha</i>	Cs				
<i>E. austin-smithii</i>					C
<i>G. bullata</i>					FM
<i>G. tonduzii</i>	Rs			FI	Cs
<i>M. holwayana</i>		HT		R	C, F, Cs.
<i>N. membranacea</i>				HM, HT	Fs
<i>N. lobata</i>					C,F,FI, HM, Cs, FM's
<i>P. povedae</i>					FM's
<i>P. auritum</i>					HM's
<i>R. pittier</i>	Fs				
<i>S. arboreum</i>					FM, HT, Fs, Fl's, FM's
<i>T. euryphyllum</i>					FM, HT, Fs
<i>W. solanacea</i>				C, F, HT, HT's	FI, Rs
<i>Z. juniperinum</i>	Cs				Rs

C: corteza, F: flor, FI: fruto inmaduro, FM: fruto maduro, HM: hojas maduras, HT: hojas tiernas, R: raíz, s: extracto seco.

nuestro modelo *in vitro* del efecto sobre eritrocitos, la gran mayoría de los extractos presentaron muy baja toxicidad.

## DISCUSIÓN

Los fármacos usados hasta ahora contra la leishmaniosis son sumamente tóxicos (Lindoso et al., 2012) por lo que existe coincidencia en que es necesario el hallazgo de nuevos productos efectivos contra esta parasitosis, que sean más tolerables. En Costa Rica actualmente las investigaciones con plantas como antiparasitarios, se circunscriben a unos pocos estudios en relación con la toxoplasmosis (Chinchilla, Marín, & Catarinella, 1990) y con la malaria (Castro et al., 1996; Chinchilla et al., 2011, 2012). Conociendo que en nuestro país existe la leishmaniosis cutánea desde hace mucho tiempo (Jaramillo-Antillón et al., 2009), y más recientemente la visceral (Carrillo et al., 1999), se hacía necesario indagar si tenemos plantas con componentes químicos con actividad contra *Leishmania* sp. Como se puede observar por la secuencia de datos obtenidos, las 67 plantas estudiadas fueron sometidas a estudios piloto que sirvieron de filtro para así descartar plantas sin ninguna o escasa actividad contra el parásito en estudio; después de este proceso, se seleccionaron 16 especies con  $CI_{50}$  menor a  $100\mu\text{g/mL}$ , límite escogido de acuerdo con los reportes de otros autores (Kakar et al., 2013) que lo estimaron adecuado, y considerando que para obtener una cantidad mayor a esa para obtener algún efecto, se necesitaría una cantidad inapropiada y poco práctica de materia prima. El hecho de que existe una ligera diferencia a favor del número de extractos activos frescos, en relación con los desecados, nos indica la importancia del estudio del material recién recolectado; esto se puede considerar congruente con el hecho de que muchos de los tratamientos populares con plantas se hace con material fresco (Idowu, Soniral, Ajana, & Aworinde, 2010). Llama la atención de que no todas las partes de las plantas mostraron la actividad antiparasitaria; en efecto el máximo de partes positivas por plantas fue de cuatro, sin

que se observaran diferencias notorias entre la positividad de cada parte.

Aunque algunos de los géneros encontrados positivos en este estudio son similares a los encontrados en otros países, como se indica a continuación, nuestras especies con componentes activos contra *Leishmania* sp. no han sido reportados aún. Varias partes de *B. frutescens*, por ejemplo, presentaron una actividad importante contra este parásito lo cual se ha observado para otras especies como *B. integrifolia* y *B. pearcei* (Fournet, Barrios, & Muñoz, 1994), pero para nuestra especie, los datos que se conocen son ambiguos y limitados a reportes muy superficiales. El más puntual es un poster presentado en una actividad de investigación estudiantil en que se menciona que extractos crudos de semilla de *B. frutescens* presentaron actividad contra *L. tarentolae* con un  $CI_{50}$  de  $2.61\mu\text{g/mL}$  (Jansen, 2011). Dentro del género *Clematis* se informa en un reporte tecnológico de Costa Rica el hallazgo de actividad anti-leishmania en *C. acapulcensis* (Moreira-González & Arnáez-Serrano, 2004), pero no se suministra información sobre *C. dioica* cuya raíz en nuestro caso, resultó bastante activa. *M. holwayana*, en que varias de su partes presentaron algún grado de actividad, se relaciona con *M. micrantha* estudiada en Argentina por Laurella et al., (2012) y *M. glomerata* (Luize et al., 2005), reportadas también como portadoras de componentes anti-leishmaniásicos importantes. *N. lobata* fue reportada por Berger, Passreiter, Cáceres, & Kubelka (2001) con actividad considerable contra este parásito, lo cual concuerda con nuestros resultados. No encontramos reportes para *S. arboreum* y *W. solanacea*. Sin embargo, en este estudio se determinó que la raíz en la primera y la corteza en la segunda, mostraron una actividad llamativa; estos hallazgos pueden considerarse entonces como los primeros para estas plantas.

La poca actividad lítica de eritrocitos, prueba usada para demostrar toxicidad, de la mayoría de los extractos promisorios, es un aspecto positivo en cuanto al eventual uso que se le vaya a dar a los componentes que se identifiquen en las plantas seleccionadas. El

hecho de que éstas se encuentran ubicadas en una zona protegida como la Reserva Biológica, garantiza la permanencia y disponibilidad de las mismas por muchos años, lo cual comienza a ser motivo de preocupación en otros países en que plantas con actividad antiparasitaria están en riesgo de extinción (Dharani et al., 2010).

Este tipo de estudios contribuyen al incremento del acervo cultural y científico de Costa Rica; además, abren las puertas al conocimiento de componentes químicos que extraídos de la rica biodiversidad costarricense, podrían eventualmente, proporcionar un aporte positivo a la salud humana por medio del tratamiento de enfermedades que como la leishmaniosis, están presentes en todas las zonas tropicales del mundo. Este estudio también incorporó el conocimiento de nuevas especies de plantas con actividad contra *Leishmania*, con relevancia internacional. La identificación específica de los componentes químicos que se relacionan con la actividad observada, son motivo de varios estudios que se llevan a cabo en nuestros laboratorios.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue patrocinado en parte por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT), el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por medio de los proyectos FI-291-09 y FI-490-2011, el Departamento de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED) y el Centro Regional de Occidente, Universidad de Costa Rica. Agradecimiento especial para Víctor Mora por su ayuda en la identificación de las plantas, a Juan Carlos Vanegas por su colaboración en los análisis estadísticos, a Laura Valerio encargada de la logística del proyecto y a los señores José Bolaños, Luis León y Hugo Pérez, por su labor asistencial y manejo de los roedores que se usan en los experimentos. Los autores agradecen al Dr. Rodrigo Zeledón por el suministro de la cepa OCR de *Leishmania* sp. También a un grupo de estudiantes de la UCIMED que colaboraron en el proyecto.

## RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad muy importante para el ser humano pero su tratamiento es bastante difícil. Por esta razón muchos investigadores han venido buscando plantas que contengan componentes químicos activos contra esta parasitosis. En Costa Rica no se tienen estudios al respecto y por eso el objetivo de este estudio fue la búsqueda de componentes activos contra *Leishmania* sp. en plantas de Costa Rica; 67 especies de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB) fueron seleccionadas para realizar este trabajo. Para ello se prepararon extractos crudos hidro-alcohólicos de material fresco o desecado de raíz, tallo, hojas maduras o tiernas, flores y frutos inmaduros o maduros. Usando pruebas presuntivas y luego específicas, se analizó el efecto de tales extractos sobre una cepa de *Leishmania* (OCR). Se consideraron plantas promisorias solamente aquellas en que al menos una de sus partes presentara un  $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ . Las plantas seleccionadas fueron: *Bocconia frutescens*, *Clematis dioica*, *Cordia megalantha*, *Eugenia austini-smithii*, *Guarea bullata*, *Guateria tonduzii*, *Mikania holwayana*, *Nectandra membranacea*, *Neurolaena lobata*, *Persea povedae*, *Piper auritum*, *Rollinia pittieri*, *Solanum arboreum*, *Tetrorchidium eurphyllum*, *Witheringia solanacea* y *Zanthoxylum juniperinum*. Existió una ligera tendencia de positividad mayor para los extractos frescos y la actividad se presentó en una y hasta más de cuatro partes de la planta. La mayoría de los extractos activos no fueron tóxicos. Se discute la importancia de estos nuevos hallazgos, en relación con el nuevo conocimiento científico y su proyección en el tratamiento de la leishmaniosis.

**Palabras clave:** *in vitro*, *Leishmania*, leishmaniosis, plantas medicinales, Costa Rica.

## REFERENCIAS

- Alexandrino-de-Oliveira, P., Reis Santos-Oliveira, J., Cavalheiros Dorval, M. E., das Chagas Brandão Da-Costa, F., Oliveira Leite Pereira, G. R., da Cunha, R. V., Mello Miranda Paniago, A., & Da-Cruz, A. M. (2010). HIV/AIDS-associated visceral leishmaniasis in patients from an endemic area in Central-west Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(5), 692-697.
- Barrantes Lobo, T. (2004). *Flora del sotobosque de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes*. San Ramón, Alajuela, Universidad de Costa Rica: Coordinación de Investigación, Sede de Occidente. Recuperado de <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/8982/>
- Berger, I., Passreiter, C. M., Cáceres, A., & Kubelka, W. (2001). Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytotherapy Research*, 15, 327-330.

- Bero, J., Hannaert, V., Chataigné, G., Hérent, M. F., & Quetin-Leclercq, J. (2011). In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *Journal Ethnopharmacology*, 137, 998-1002.
- Brito, A. M. G., dos Santos, D., Rodrigues, S. A., Brito, R. G., & Xavier-Filho, L. (2013). Plants with anti-*Leishmania* activity: Integrative review from 2000 to 2011. *Pharmacognosy Reviews*, 7(13), 34-41.
- Calderón, A. I., Romero, L. I., Ortega-Barria, E., Solís, P. N., Zacchino, S., Gimenez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Guerra, C., Espinosa, A., Correa, M., & Gupta, M. P. (2010). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, 48, 545-553.
- Carrillo, J., Chinchilla, M., Valverde, B., Porras, O., & Mora, L. (1999). Visceral leishmaniasis in Costa Rica: first case report. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 678-679.
- Castillo, E., González-Rosende, M. E., Dea, M. A., & Galiana, C. (2011). Productos naturales con actividad leishmanicida y tripanocida. *Revista de fitoterapia*, 11, 149-156.
- Castro, O., Barrios, M., Chinchilla, M., & Guerrero, O. M. (1996). Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*. *Revista de Biología Tropical*, 44, 361-367.
- Cechinel Filho, V., Meyre-Silva, C., Niero, R., Bolda Mariano, L. N., Gomes do Nascimento, F., Vicente Farias, I., Gazoni, V. F., dos Santos Silva, B., Giménez, A., Gutierrez-Yapu, D., Salamanca, E., & Malheiros, A. (2013). Evaluation of Antileishmanial Activity of Selected Brazilian Plants and Identification of the Active Principles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi:10.1155/2013/265025
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Tamayo, G., & Sittenfeld, A. (2001). Empleo de técnicas y materiales biológicos en la búsqueda de productos activos contra la malaria. *Información Tecnológica*, 12, 187-192.
- Chinchilla, M., Valerio, I., Sánchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Martínez, L., González, A., Vanegas, J. C., & Apéstegui, A. (2012). In vitro antimalarial activity of extracts of some plants from a biological reserve in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 60, 881-891.
- Chinchilla, M., Valerio, I., Sánchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Martínez, L., González, A., & Vanegas, J. C. (2011). Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84, 115-123.
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Abarca, G., Barrios, M., & Castro, O. (1998). An *in vivo* model to study the anti-malaric capacity of plant extracts. *Revista de Biología Tropical*, 46, 35-39.
- Chinchilla, M., Marín, R., & Catarinella, G. (1990). Increase of sulfadiazine effect against *Toxoplasma gondii* by using watermelon or cantaloupe seeds. *Revista de Biología Tropical*, 38, 235-241.
- Dawit, G., Girma, Z., & Simenew, K. (2012). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Acta Parasitológica Globalis*, 3, 43-53.
- De Lima, J. P. S., Pinheiro, M. L. B., Santos, A. M. G., Pereira, J. L. S., Santos, D. M. F., Barison, A., Silva-Jardim, I., & Costa, E. V. (2012). In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, 4, 692-702.
- Dharani, N., Rukunga, G., Yenesew, A., Mboru, A., Mwaura, L., Dawson, L., & Jamnadass, R. (2010). *Common Antimalarial Trees and Shrubs of East Africa: a Description of Species and a Guide to Cultivation and Conservation Through Use*. Nairobi: The World Agroforestry Centre (ICRAF).
- Díaz Báez, M. C., Bulus Rossini, G. D., & Pica Granados, Y. (2004). Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. In G. Castillo-Morales (Ed.), *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas* (pp. 99-124). México: IMTA.
- Fattahi, A., Reza, A., Hossein, M., Barzegar, K., & Ghafourzadeh, M. (2011). The in vivo antileishmanial activity of alcoholic extract from *Nigella sativa* seeds. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 1504-1510.
- Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Scull, R., Vermeersch, M., Cos, P., & Maes, L. (2008). In vitro anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* L. and *Artemisia absinthium* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 615-618.
- Fournet, A., Barrios, A. A., & Muñoz, V. (1994). Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Ethnopharmacology*, 41, 19-37.
- García, M., Monzote, L., Scull, R., & Herrera, P. (2012). Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. *ISRN Pharmacology*, 2012. doi: 10.5402/2012/104540
- Githinji, E. K. G., Irungu, L. W., Tonui, W. K., Rukunga, G. M., Mutai, C., Muthaura, C., Lugalia, N. R., Gikandi, G., Wainaina, C. W., Ingonga, J. M., & Wanjoya, A. (2010). In vitro effects of *Warburgia ugandensis*, *Psidium punctulata* and *Chasmanthera dependens* on *Leishmania major* promastigotes. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, 7, 264-275.

- Gómez-Laurito, J., & Ortiz, R. (2004). Lista con anotaciones de las angiospermas de la Reserva Biológica Alberto Brenes (Microcuencas de los ríos San Lorenzo y San Lorenzo), Costa Rica. *Lankesteriana*, 4, 113-142.
- Idowu, O. A., Sonirai, O. T., Ajana, O., & Aworinde, D. O. (2010). Ethnobotanical Survey of antimalarial plants used in Ogun State, Southwest Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, 55-60.
- Jansen, E. (2011). Screening extracts from the tropical pioneer plants *Bocconia frutescens*, *Guettarda poasana*, and *Phytolacca rivinoides* for anti-parasitic activity. 10th annual celebration for undergraduate research and creative performance. Recuperado de [http://digitalcommons.hope.edu/curcp\\_10/156/](http://digitalcommons.hope.edu/curcp_10/156/).
- Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., & Lobo-Philip, R. (2009). Estado actual de la leishmaniosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 51, 158-164.
- Kakar, A. M., Khan, A. A., Nabi, S., Kakar, M. A., Yasin-zai, M., & Al-Kahraman, M. S. A. (2013). In vitro antileishmanial, cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Thuspeinanta brahuica* leaves extract and its fractions. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 520-528.
- Laurella, L. C., Frank, F. M., Sarquiz, A., Alonso, M. R., Giberti, G., Cavallaro, L., Catalan, C. A., Cazorla, S. I., Malchiodi, E., Martino, V. S., & Sulsen, V. P. (2012). In vitro evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from argentinean *Mikania* species. *The Scientific World Journal*, 2012, doi:10.1100/2012/121253
- Lindoso, J. A., Costa, J. M., Queiroz, I. T., & Goto, H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 3, 69-77.
- Luize, P. S., Tiunan, T. S., Morello, L. G., Korehiza, P., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B. P., Cortez, D. A. G., Mello, J. C. P., & Nakamura, C. V. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 85-94.
- Moreira-González, I., & Arnáez-Serrano, E. (2004). Distribución y fenología de *Hippobroma longiflora* Campanulaceae y *Clematis acapulcensis* Ranunculaceae y su actividad biológica sobre Leishmaniasis. *Tecnología en marcha*, 17, 31-39.
- Mwangi, E. S. K., Keriko, J. M., Machocho, A. K., Wanyonyi, A. W., Malebo, H. M., Chhabra, S. C., & Tarus, P. K. (2010). Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trielocarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 726-731.
- Oseni, L. A., Suleman D., & Samson, A. A. (2013). Natural products in antileishmanial drug discovery: a review. *Journal of Asian Scientific Research*, 3, 157-173.
- Peixoto, J. A., Andrade, M. L., Crotti, A. E. M., Veneziani, R. C., Gimenez, V. M. M., Januário, A. H., Groppo, M., Magalhães, L. G. M., dos Santos, F. F., Albuquerque, S., da Silva, A. A., & Cunha, W. R. (2011). Antileishmanial activity of the hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffii*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. *Molecules*, 6, 1825-1833.
- Rocha, L. G., Almeida, J. R. G. S., Macedo, R. O., & Barboza-Filho, J. M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12, 514-535.
- Sánchez, R. (2000). *Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes*. San José, Costa Rica.
- Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M. R., Postorino, M. C., Cosentino, S., Serra, A., Cacopardo, B., & Nunari, G. (2013). Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. *BioMed Research International*, 2013. Recuperado de [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853773).
- Vieira, P. C., Mafezoli, J., Pupo, M. T., Fernandes, J. B., Das, M. F., da Silva, G. F., Albuquerque, S., Oliva, G., & Pavão, F. (2001). Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 617-622.
- World Health Organization. (2010). *Working to overcome the global impact of neglected tropical disease*. (First WHO Report on Neglected Disease). Geneva: World Health Organization.

## Ethnic background and *CYP2D6* genetic polymorphisms in Costa Ricans

Carolina Céspedes-Garro<sup>1,2</sup>, Gerardo Jiménez-Arce<sup>1</sup>, María-Eugenia G. Naranjo<sup>2</sup>, Ramiro Barrantes<sup>1\*</sup>, Adrián Llerena<sup>2\*</sup> & CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics RIBEF.

1. Genetics Section, School of Biology, University of Costa Rica, 2060 San Pedro, San José, Costa Rica; ccg004@gmail.com, gerardo.jimenez@ucr.ac.cr, ramiro.barrantes@ucr.ac.cr
  2. CICAB Clinical Research Centre, Extremadura University Hospital and Medical School, Badajoz, Spain; meglez-naranjo@gmail.com, allerena@unex.es
- \* Correspondence

Received 14-I-2014.      Corrected 28-VI-2014.      Accepted 29-VII-2014.

**Abstract:** *CYP2D6* differences have already been demonstrated within Latin American populations by the CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics (RIBEF, as per the acronym in Spanish). However, within the population of Costa Rica, no research has been conducted until now, even though this population has a trihybrid component ancestry that represents an interesting condition. Thus, the present study was aimed to determine the frequency of Ultra-rapid Metabolizers (UMs) and Poor Metabolizers (PMs) in a Costa Rican population, as well as to determine whether there are differences in the *CYP2D6*-predicted phenotype frequencies among three Costa Rican groups with different ethnic backgrounds. Additionally, these frequencies of PMs and UMs obtained were compared with Ibero-American populations published data. Finally, we also aimed to describe allele frequencies among different Costa Rican ethnic groups. This research has been undertaken within the framework of the RIBEF CEIBA Consortium studies on Latin American populations. A total of 385 individuals were included in the study: 139 mestizos, 197 Amerindians, and 49 Afro-Caribbeans. *CYP2D6* genotypes were determined by XL-PCR and Real-Time PCR. The *CYP2D6* variant alleles \*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35 and \*41 were also determined. For the entire Costa Rican population, the frequency of PMs and UMs was 6% and 6.5%, respectively. The percentage of UMs in the mestizo population was higher than in the Amerindian population. *CYP2D6* UMs vary from 3.6% to 10.1% and PMs from 1.4% to 10.2% among three Costa Rican groups. The highest frequencies of UMs (10.1%) and PMs (10.2%) were found in the mestizo and Amerindian populations, respectively. In conclusion, the frequencies of UMs and PMs for *CYP2D6* varied widely across the mestizo, Amerindian and Afro-Caribbean Costa Rican populations. Future research in this population should be oriented to identify new *CYP2D6* variants through sequencing methods, as well as to determine *CYP2D6* phenotype, in order to establish the phenotype-genotype relation. Finally, further studies involving genetic markers of ancestry are needed in the Costa Rican population. *Rev. Biol. Trop.* 62 (4): 1659-1671. Epub 2014 December 01.

**Key words:** *CYP2D6*, Costa Rica, Amerindian, Afro-Caribbean, mestizo, populations, Poor Metabolizers, Ultra-rapid Metabolizers.

*CYP2D6* is involved in the metabolism of widely used drugs, such as antidepressants, antipsychotics, antihypertensives, analgesics, and beta-blockers (Ingelman-Sundberg, 2005). The *CYP2D6* gene, located on chromosome 22q13.1, is highly polymorphic, with alleles causing absent, reduced, normal and increased catalytic activity (CYP Alleles Nomenclature Database).

Inter-ethnic differences in such cytochrome P450 polymorphism might be partially responsible for the variations in drug disposition among populations. During the 16<sup>th</sup> century, people from the Iberian Peninsula arrived to different places of America leading current Costa Rican, Latin American, and Caribbean populations to have different degrees of admixture (Gaedigk et al., 2010; Llerena et

al., 2012; Montané-Jaime, Lalla, Steimer, & Gaedigk, 2013). Latin American populations are products of a process of admixture, mainly including groups of Amerindian, European and African ancestry (Sans, 2000). The Costa Rican population has been described as having estimated mean ancestry proportions for European, Amerindian, and African components of 54%, 32%, and 13%, respectively (Segura-Wang, Raventós, Escamilla, & Barrantes, 2010). Therefore, it could be of relevance to determine potential differences across the multi-ethnic Costa Rican population.

A high frequency of Ultra-rapid Metabolizers (UMs) has been previously described in Spanish population (Llerena, Dorado, & Peñas-Lledó, 2009; Peñas-Lledó et al., 2012). Given the Iberian Peninsula's influence on the hybrid population, we hypothesized that a high frequency of UMs would be present in the mestizo population. It was also hypothesized that high frequencies of *CYP2D6\*17* would be found in the Afro-Caribbean population due to their African ancestry and *CYP2D6\*10* within the Amerindian population due to their Asian ancestry (Bradford, 2002).

In Central American countries, there are just a few studies in Panama (Arias et al., 1986; Arias, Jorge, Lee, Barrantes, & Inaba, 1988), Nicaragua (Llerena et al., 2012; Llerena et al., 2013) and Costa Rica (reporting some alleles of a Costa Rican Amerindian population) (Jorge & Arias, 1995). *CYP2D6* genetic polymorphisms studies have been carried out in Latin American countries supported by the CEIBA. FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics (RIBEF) (de Andrés et al., 2013; Rodeiro et al., 2012), including Ecuadorians (Dorado et al., 2012), Mexicans (Sosa-Macías, Dorado, Alanís-Bañuelos, Llerena, & Lares-Asseff, 2010) and Cubans (González et al., 2008; Llerena et al., 2012; Llerena et al., 2013; Peñas-Lledó, Dorado, Pacheco, González, & Llerena, 2009). However, this will constitute the first report of a Costa Rican population including groups from different ethnic backgrounds.

The present study aimed to determine the frequency of UMs and Poor Metabolizers (PMs) in a Costa Rican population, as well as to determine whether there are differences in *CYP2D6*-predicted phenotype frequencies among three Costa Rican groups with different ethnic backgrounds. Additionally, the frequency of PMs and UMs obtained in this study was compared with published data from Ibero-American populations, and finally, this study also aimed to describe allele frequencies among different Costa Rican ethnic groups.

## MATERIALS AND METHODS

**Subjects:** The study comprised 385 healthy individuals belonging to three ethnic groups: Amerindian (n=197), Afro-Caribbean (n=49) and mestizo (n=139).

The DNA samples were obtained from a DNA biobank of the School of Biology of the University of Costa Rica. The samples were collected and stored after approval from review boards of the University of Costa Rica, and have been widely studied (Azofeifa et al., 2004; Barrantes et al., 1990; Barrantes, Smouse, Neel, Mohrenweiser, & Gershowitz, 1982; Barrantes, 1993a, 1993b; Morera, Barrantes, & Marin-Rojas, 2003; Morera & Barrantes, 2004; Reich et al., 2012; Santos, Ward, & Barrantes, 1994; Thompson, Neel, Smouse, & Barrantes, 1992; Wang et al., 2007, 2008). All the samples were already classified according to the ethnic origin and previous studies (see inclusion criteria), codified, and stored with an ID. Demographic data of these populations are available elsewhere (Barrantes, 1989; Madrigal, 2006; Morera et al., 2003).

The inclusion criteria were:

- **Phenotype features:** For the Amerindian population, the criteria were copper-colored skin, straight hair, slanted eyes, and short stature; in the Afro-Caribbean population, dark skin, curly hair, flat nose, and prominent cheekbones were the criteria; the Mestizo population comprised all those

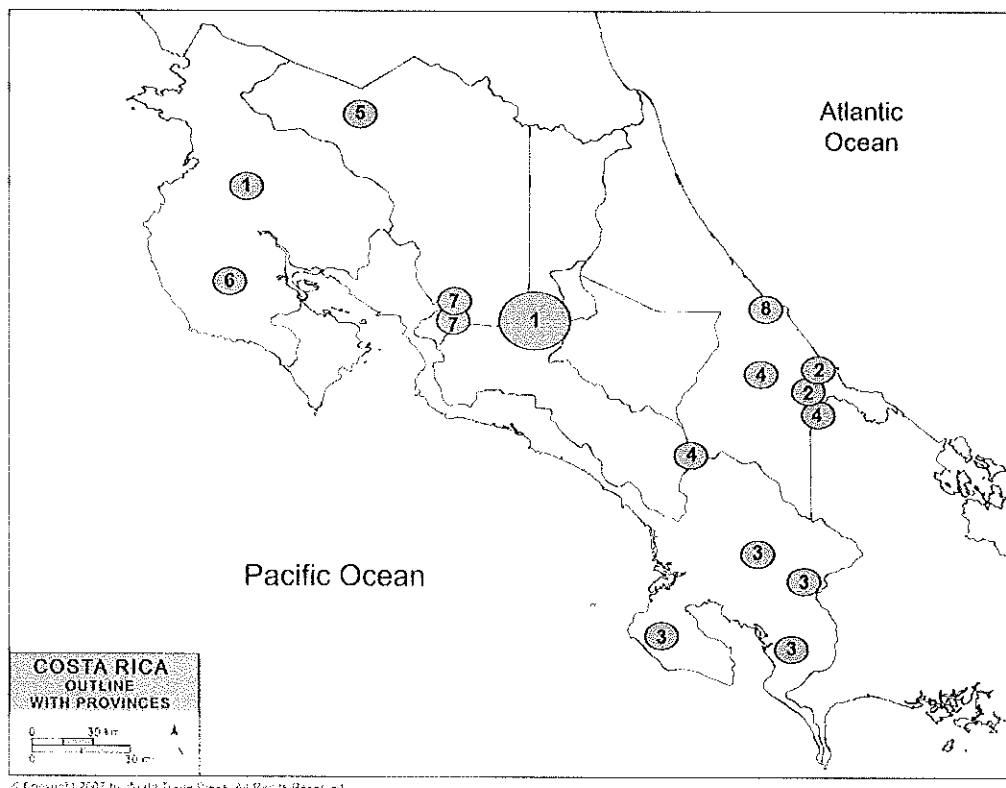


subjects not included in any of the aforementioned groups.

- **Places of residence:** For the Amerindian group, the places of residence were Matambu Indian locality (Chorotega), the South and the Pacific area (Guaymi), the Atlantic Talamanca and the Pacific area (Cabecar), the Talamanca area (Bribri), the Quitirrisi and Zapaton Indian localities (Huetar), and the Margarita and Tonjibe Guatuso Indian localities (Guatuso or Maleku). The samples of the Afro-Caribbean population were collected from volunteers living in the Atlantic coastal region of Limon. The mestizo population was selected from people living in the Guanacaste region, and in the Western or Central Valley of Costa Rica (Fig. 1). The inclusion of an individual in a group excluded that individual from being part of any other population.

- **Genetic markers such as blood group systems:** ABO (O for Amerindians and B for the Afro-Caribbeans), rhesus, MNS, P. Kell, Kidd, Duffy, Diego, and Lewis; plasmatic protein systems (albumin, transferrin, haptoglobin, and ceruloplasmin) (Barrantes et al., 1990; Bieber, Bieber, Rodewald, & Barrantes, 1996); single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Herrmann et al., 2002); microsatellites (Wang et al., 2007); mitochondrial DNA (Santos et al., 1994) and chromosome Y (Ruiz-Narváez et al., 2005).

**Genotyping procedure:** For genotyping, the CEIBA.FP Consortium methodology was followed. To detect the presence of allelic variants harboring a *CYP2D6\*5* gene deletion or a duplication, long range (XL)-PCR was performed as described in detail elsewhere (Fig. 2) (Dorado et al., 2005). Subjects



**Fig. 1.** The approximate geographic locations of the Costa Rican populations studied. 1: mestizo population. 2: Bribri. 3: Guaymi. 4: Cabecar. 5: Guatuso. 6: Chorotega. 7: Huetar. 8: Afro-Caribbean population.



Fig. 2. PCR output for *CYP2D6\*5* on a 0.8% agarose gel. Identification of lanes (from left to right) 1: positive control (5.1kb + 3.5kb), 2 and 4-7: samples negative for deletion (*wild-type*; 5.1kb) and 3: sample positive for deletion (*CYP2D6\*5*).

positive for a duplication or deletion were further characterized for gene copy number with the TaqMan assay Hs00010001\_cn, which specifically amplifies exon 9 sequences and does not amplify *CYP2D7* or *CYP2D8* pseudogenes or *CYP2D6/CYP2D7* hybrids alleles carrying *CYP2D7* exon 9 sequences. Genotype analysis for the *CYP2D6\*2* (-1584 C>G), \*3 (2549A>del), \*4 (100 C>T, 1846G>A), \*6 (1707 T>del), \*10 (100 C>T), \*17 (1023 C>T), \*29 (3183 G>A), \*35 (-1584 C>G and 31 G>A), and \*41 (2988 G>A) allelic variants was carried out on genomic DNA, using commercially available TaqMan assays as previously described (Dorado et al., 2012). To discriminate among *CYP2D6\*1xN*, \*2xN, \*4xN and \*10xN alleles, a 10kb long XL-PCR fragment was generated from duplication-positive subjects and tested for respective SNPs by an established PCR-RFLP approach (Dorado et al., 2005).

#### Predicted hydroxylation capacity group:

In order to extrapolate genetic data to metabolic phenotype information, an activity score was utilized as previously described (Gaedigk et al., 2008; Llerena et al., 2012).

Zero value was assigned to *CYP2D6\*3*, \*4, \*4xN, \*5, \*6 variants; 0.5 to each copy of *CYP2D6\*10*, \*17, \*29, \*41 alleles; one was assigned to *CYP2D6 wt*, \*2, \*35, and more than two (depending on the number of copies) to the multiplication of the active alleles (*wt*xN, \*2xN). Individuals with zero active genes were classified as poor metabolizers (PMs), and

those with more than two active gene copies were classified as Ultra-rapid Metabolizers (UMs) (Gaedigk et al., 2008; Llerena et al., 2012).

The differences in *CYP2D6* allele frequencies were compared using the  $\chi^2$ -test and/or Fisher's exact test. P-values <0.05 were regarded as statistically significant. Hardy-Weinberg equilibrium was determined by comparing the genotype frequencies with the expected values using a contingency table  $\chi^2$  statistic with Yate's correction. Statistical analyses were performed using the STATISTICA 4.3 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) and GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) software.

## RESULTS

*CYP2D6* allele frequencies are given in table 1. Multiplications of active genes (*wt*xN, \*2xN) were present in 15 individuals of the mestizo population and in seven of each of the Amerindian and Afro-Caribbean populations (Table 1).

Null activity alleles \*4 and \*5 frequencies in the Amerindian population were higher (22.6% and 4.8%, respectively) than in the mestizo group (10.4% and 3.2%, respectively;  $p<0.05$ ) (Table 1). The frequencies of alleles with decreased activity (\*17 and \*29) in the Afro-Caribbean population were higher (18.4% and 11.2%) than in the other two populations ( $p<0.05$ ), and the *CYP2D6\*10* frequency in the

TABLE 1  
CYP2D6 allele and active gene frequencies in three Costa Rican ethnic groups studied

Allele	Costa Rica		Mestizo		Amerindian		Afrocaribbean			
	n=385	Frequency	n=278	Frequency	n=394	Frequency	n=98	Frequency		
wt	370	0.481	134	0.482	199	0.505	37	0.378	*	**
*2	115	0.149	50	0.180	59	0.150	6	0.061	*	**
*3	5	0.006	4	0.014	0	0.000	1	0.010		
*4	122	0.158	29	0.104	89	0.226	4	0.041		**
*5	32	0.042	9	0.032	19	0.048	4	0.041		
*6	2	0.003	2	0.007	0	0.000	0	0.000		
*10	7	0.009	3	0.011	1	0.003	3	0.031		**
*17	31	0.040	6	0.022	7	0.018	18	0.184	*	**
*29	17	0.022	4	0.014	2	0.005	11	0.112	*	**
*35	5	0.006	1	0.004	3	0.008	1	0.010		
*41	26	0.034	17	0.061	8	0.020	1	0.010		
wtXN	16	0.021	8	0.029	4	0.010	4	0.041		
*2XN	13	0.017	7	0.025	3	0.008	3	0.031		
*4XN	6	0.008	4	0.014	0	0.000	2	0.020		**
*10XN	2	0.003	0	0.000	0	0.000	2	0.020		**
*17XN	1	0.001	0	0.000	0	0.000	1	0.010		
Active genes <sup>a</sup>										
0		0.060	2	0.014	20	0.102	1	0.020	*	
0.5		0.052	10	0.072	6	0.030	4	0.082		
1		0.270	32	0.230	62	0.315	8	0.163		
1.5		0.114	18	0.129	12	0.061	16	0.327		
2		0.439	63	0.453	90	0.457	16	0.327		
>2		0.065	14	0.101	7	0.036	4	0.082	*	

n: number of subjects. \*p<0.05 compared with mestizo by Fisher's exact Test. \*\*p<0.05 compared with the Amerindian group by Fisher's exact Test. \*CYP2D6\*3, \*4, \*4XN, \*5, \*6 variants were assigned the value of zero; CYP2D6\*10, \*17, \*29, \*41 alleles were assigned 0.5 for each copy; CYP2D6 wt, \*2, \*35 were assigned one, and the multiplication of the active alleles (wtXN, \*2XN) were assigned  $\geq 2$  (depending on the number of copies).

Amerindian population (0.3%) was lower than in the Afro-Caribbean (3.1%; p<0.05).

The CYP2D6 frequencies for each activity score group are given in table 1. The entire Costa Rican population frequency of PMs and UMs were 6% and 6.5% respectively.

As expected, the percentage of UMs in the mestizo population (10.1%) was higher than in the Amerindian population (3.6%, p<0.05) (Table 1). However, the frequency of individuals classified as PMs (zero active genes) was higher in Amerindians (10.2%) than in the mestizo population (1.4%, p<0.05). The frequency of UMs (8.2%) and PMs (2%) of the Afro-Caribbean population was not different to any of the Costa Rican populations studied.

The frequencies of CYP2D6 genotypes are listed in table 2. The mestizo population showed more diversity concerning genotypes in comparison with the other Costa Rican populations studied. In all three groups, the most frequently found CYP2D6 genotypes belonged to the classification of two active genes (Table 2). Published data from Latin American populations is used to compare results with the Costa Rican populations (Table 3).

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study in a Costa Rican population that

TABLE 2  
Frequencies of cytochrome *P450 2D6* (*CYP2D6*) genotypes in three Costa Rican groups (n=385)

Genotype	Activity score	Mestizo n=139			Amerindian n=197			Afro-Caribbean n=49		
		n	Frequency	Expected freq	n	Frequency	Expected freq	n	Frequency	Expected freq
*4/*4	0	1	0.007	0.011	13	0.066	0.051	0	—	0.002
*4/*5	0	1	0.007	0.007	7	0.036	0.022	0	—	—
*3/*4x3	0	0	—	—	0	0.000	—	1	0.020	—
*3/*41	0.5	1	0.007	0.002	0	—	—	0	—	—
*4/*10	0.5	0	—	—	1	0.005	0.001	0	—	—
*4/*17	0.5	2	0.014	0.005	4	0.020	0.008	0	—	—
*4/*29	0.5	0	—	—	0	—	—	1	0.020	0.009
*4/*41	0.5	3	0.022	0.013	1	0.005	0.009	0	—	—
*5/*17	0.5	0	—	—	0	—	—	2	0.041	0.015
*5/*29	0.5	0	—	—	0	—	—	1	0.020	0.009
*5/*41	0.5	1	0.007	0.004	0	—	—	0	—	—
*6/*41	0.5	1	0.007	0.001	0	—	—	0	—	—
*4x2/*10	0.5	2	0.014	0.000	0	—	—	0	—	—
wt/*3	1	1	0.007	0.013	0	—	—	0	—	—
wt/*4	1	16	0.115	0.100	33	0.168	0.228	0	—	—
wt/*5	1	4	0.029	0.031	10	0.051	0.048	1	0.020	0.031
*2/*4	1	5	0.036	0.037	16	0.081	0.068	0	—	—
*2/*5	1	3	0.022	0.012	2	0.010	0.014	0	—	—
*2/*6	1	1	0.007	0.003	0	—	—	0	—	—
*4/*35	1	0	—	—	1	0.005	0.004	0	—	—
*10/*17	1	0	—	—	0	—	—	2	0.041	0.011
*17/*17	1	0	—	—	0	—	—	2	0.041	0.034
*17/*29	1	0	—	—	0	—	—	2	0.041	0.041
wt/*4xN <sup>-</sup>	1	2	0.014	0.013	0	—	—	0	—	—
*2/*4X3	1	0	—	—	0	—	—	1	0.020	—
wt/*10	1.5	0	—	—	0	—	—	1	0.020	0.023
wt/*17	1.5	4	0.029	0.021	1	0.005	0.018	4	0.082	0.139
wt/*29	1.5	3	0.022	0.013	0	—	0.005	6	0.122	0.085
wt/*41	1.5	6	0.043	0.059	6	0.030	0.020	1	0.020	0.008
*2/*17	1.5	0	—	—	2	0.010	0.005	1	0.020	0.022
*2/*29	1.5	0	—	—	2	0.010	0.002	0	—	—
*2/*41	1.5	4	0.029	0.022	1	0.005	0.006	0	—	—
*10/*35	1.5	1	0.007	0.000	0	—	—	0	—	—
*17/*35	1.5	0	—	—	0	—	—	1	0.020	0.004
*10x2/*17	1.5	0	—	—	0	—	—	1	0.020	—
*17x2/*29	1.5	0	—	—	0	—	—	1	0.020	—
wt/wt	2	28	0.201	0.232	60	0.305	0.255	9	0.184	0.143
wt/*2	2	32	0.230	0.174	21	0.107	0.152	2	0.041	0.046
wt/*35	2	0	—	0.004	1	0.005	0.008	0	—	0.008
*2/*2	2	2	0.014	0.032	7	0.036	0.023	1	0.020	0.004
*2/*35	2	0	—	—	1	0.005	0.002	0	—	—
wtx2/*3	2	1	0.007	0.001	0	—	—	0	—	—
wtx2/*4	2	0	—	—	0	—	—	3	0.061	—
wt/*10x2	2	0	—	—	0	—	—	1	0.020	—

TABLE 2 (Continued)

Genotype	Activity score	Mestizo n=139			Amerindian n=197			Afro-Caribbean n=49		
		n	Frequency	Expected freq	n	Frequency	Expected freq	n	Frequency	Expected freq
<i>wt/wtxN</i> <sup>*</sup>	>2	5	0.036	0.028	4	0.020	0.010	1	0.020	
<i>wt/*2xN</i> <sup>^</sup>	>2	5	0.036	0.024	3	0.015	0.008	2	0.041	
<i>wtx5/*3</i>	>2	1	0.007	0.001	0	—		0	—	
<i>wtx3/*41</i>	>2	1	0.007	0.004	0	—		0	—	
<i>*2x2/*2</i>	>2	1	0.007	0.009	0	—		0	—	
<i>*2x3/*17</i>	>2	0	—		0	—		1	0.020	
<i>*2x2/*29</i>	>2	1	0.007	0.001	0	—		0	—	

n: number of subjects. <sup>\*</sup>N=2 in one individual, N=3 in one individual. <sup>\*</sup>N=2 in three individuals from the mestizo group, three from the Amerindian group, and in one individual from the Afro-Caribbean group; N=3 in two individuals from the mestizo group and one from the Amerindian group. <sup>^</sup>N=2 in three individuals from the mestizo group, three from the Amerindian group and in two individuals from the Afro-Caribbean group; N=3 in one individual from the mestizo group; N=4 in one individual from the mestizo group.

examined the predicted metabolic phenotype frequencies of CYP2D6 (UMs and PMs) in three ethnic groups. The entire Costa Rican population frequency of PMs (6%) is consistent with the Portuguese (Albuquerque et al., 2013), the Mexican-American (Casner, 2005), and the Colombian mestizo (Isaza, Henao, López, & Cacabelos, 2000) populations. Likewise, the frequency of UMs for the Costa Rican population is similar to those reported for the Spanish population (6.1%) (Peñas-Lledó et al., 2012).

Considering the ethnicity of the analyzed populations, the frequency of UMs in the mestizo group (10.1%) is similar to those reported in a Spanish population (6.1%) (Peñas-Lledó et al., 2012), those of a Mexican admixed population (9.1%) (López, Guerrero, Jung-Cook, & Alonso, 2005), and it is lightly greater than the percentage of UMs determined with debrisoquine in a Spanish population (5.2%,  $p=0.053$ ) (Llerena et al., 2009). Moreover, the high frequency of PMs in the Costa Rican Amerindian population (10.2%) is similar to that reported in an Amerindian population from Argentina and Paraguay (12.8%) (Bailliet et al., 2007). Despite the small number of individuals in the Afro-Caribbean group, the frequencies of PMs and UMs are comparable to those of Brazilian populations with African ancestry (Kohlrausch et al., 2009; Silveira, Canalle, Scrideli, Queiroz, & Tone, 2009).

Individuals carrying two inactive alleles will produce a non-functional protein. Therefore, all of them will likewise be determined as PMs in phenotyping studies. However, discordance between the identification of UMs by molecular methods and phenotype has been reported (Llerena et al., 2012; Lovlie, Daly, Molven, Idle, & Steen, 1996), so the predicted phenotype estimation needs to be confirmed with phenotyping studies.

Variability of *CYP2D6* alleles was found within this Costa Rican population, in accordance with the finding that the Costa Rican population is genetically heterogeneous (Moreira et al., 2003; Morera & Barrantes, 2004). The high frequency of PMs in the Amerindian group can mainly be accounted for by the presence of the null allele *CYP2D6\*4* in this population (22.6%) at a frequency similar to those found in Amerindian populations of Argentina-Paraguay (17.8%) (Bailliet et al., 2007). However, it is higher than those reported in Panamanian Embera (14%) and Ngwabe (17.1%) populations ( $p<0.05$ ) (Jorge, Eichelbaum, Griese, Inaba, & Arias, 1999).

Regarding reduced activity alleles, the *CYP2D6\*17* and *CYP2D6\*29* frequencies in the Afro-Caribbean population were similar to those reported for an Afro-American population (Gaedigk, Bradford, Marcucci, & Leeder, 2002), in agreement with their African ancestry

TABLE 3  
Percentages (%) of UMs and PMs for CYP2D6 predicted phenotypes and phenotypes in the Costa Rican population (n=385) and other Latino, Amerindian and Iberian Peninsula populations previously studied

Population	Ancestry	n	Predicted phenotype		Phenotype		Ref.
			PMs (%)	UMs (%)	PMs (%)	UMs (%)	
Argentina-Paraguay	Amerindian	86	12.8				(Bailliet et al., 2007)
Brazil	African	33	0				(Silveira et al., 2009)
	Mulatto	89	1.1				(Silveira et al., 2009)
	Caucasian	178	2.8				(Silveira et al., 2009)
Brazil	African	87	3.5	3.5			(Kohlrausch et al., 2009)
	Caucasian	92	3.3	9.8			(Kohlrausch et al., 2009)
Cuba	Caucasian	130	2.3	6.2			(Llerena et al., 2012)
	Admixed	126	2.4	4.8			(Llerena et al., 2012)
Ecuador	Admixed	118	0.8	1.7			(Llerena et al., 2012)
Mexico	Mexican-American	50	6		6		(Casner, 2005)
Mexico	Mexican-American	264	2.7	1.1			(Luo, Giedigk, Aloumanis, & Wan, 2005)
Mexico	Admixed	349	1.7				(Mendoza et al., 2001)
Mexico	Admixed	285			3.2		(Mendoza et al., 2001)
Mexico	Admixed	243	2.1	9.1			(López et al., 2005)
Mexico	Admixed	100			10		(López et al., 2005)
Mexico	Amerindian	58			0		(Sosa-Macias et al., 2006)
	Admixed	88			6.8		(Sosa-Macias et al., 2006)
	Amerindian	85	0				(Sosa-Macias et al., 2006)
	Admixed	110	3.6				(Sosa-Macias et al., 2006)
Nicaragua	Admixed	98	4.1	3.1			(Llerena et al., 2012)
Panama-Colombia	Amerindian/Ngawbe	344			4.4		(Jorge et al., 1999)
	Amerindian/Embera	153			2.2		(Jorge et al., 1999)
Panama	Amerindian-Cuna	51			0		(Arias et al., 1986)
Panama	Amerindian-Ngawbe Guaymi	121			5.2		(Arias et al., 1988)
Portugal	Caucasian	300	6.3	4.3			(Albuquerque et al., 2013)
Spain	Caucasian	925			4.9		(Llerena, 1993)
Spain	Caucasian	327	7	6.1			(Peñas-Lledó et al., 2012)
Spain	Caucasian	290	2.4				(Crescenti et al., 2007)
Uruguay	Admixed	302			7.3		(Estevez, Giusti, Parrillo, & Oxandabarat, 1997)
Venezuela	Admixed	100	3				(Griman, Meran, Camargo, & Chiurillo, 2009)
Venezuela	Admixed	149	2.01				(Griman et al., 2012)
	Amerindian/Bari	40	25				(Griman et al., 2012)
	Amerindian/Panare	46	0				(Griman et al., 2012)
	Amerindian/Pemon	40	0				(Griman et al., 2012)
	Amerindian/Warao	29	0				(Griman et al., 2012)
	Amerindian/Wayuu	24	0				(Griman et al., 2012)
Costa Rica	Admixed	139	1.4	10.1			This study
	Amerindian	197	10.2	3.6			
	Afro-Caribbean	49	2	8.2			

n= number of subjects; Ref.=references.

(Bradford, 2002). Moreover, the *CYP2D6\*10* frequency in the Amerindian group (0.3%) was similar to that of the Tepehuano (0%) (Sosa-Macías et al., 2006, 2010) and Mapuche (1.8%) (Muñoz et al., 1998) populations, but lower than other Amerindian populations (7.1% and 6.9%;  $p < 0.05$ ) (Bailliet et al., 2007; Jorge et al., 1999).

A limitation of this study was that the number of individuals in the Afro-Caribbean population was low ( $n=49$ ). Moreover, the inclusion criteria did not include ancestry informative markers analysis (AIMs). In this sense, further studies involving genetic markers of ancestry are needed in the Costa Rican population. It is necessary to remark that even though this study reports allele frequencies of *CYP2D6* for Costa Ricans, they might not be representative of the population and might have been influenced by random effects.

Furthermore, the study of populations with complex ancestry such as Latin American populations comprises the fact that novel or rare variants (Fohner et al., 2013; Gaedigk et al., 2010) might appear, leading to poor metabolism or reduced function (Montané-Jaime et al., 2013). In the future, sequencing the *CYP2D6* gene in these populations might be suitable to detect relevant genetic variants.

Given the percentage of UMs found in the mestizo and Afro-Caribbean population and of PMs in the Amerindian group, it might be appropriate to follow available guidelines that provide information relating to the interpretation of *CYP2D6* genotype test results to guide the dosing of different drugs (Crews et al., 2012; Hicks et al., 2013). Likewise, the information provided by this study supports that it might be appropriate to consider the development of drug treatment guidelines taking into account population ethnic background, meaning specific alleles of the population tested, to improve drug safety and efficacy in Costa Rican and Latin American populations.

In conclusion, we report here for the first time the frequency of PMs (6%) and UMs (6.5%) in a Costa Rican population. Secondly, we found a difference between the frequency

of predicted UM and PM phenotype across ethnicity in Costa Ricans.

## ACKNOWLEDGMENTS

CCG was supported by a fellowship of the University of Costa Rica in the PhD program of the University of Extremadura. The study is part of the Research Program entitled "Genética, Ecología y Salud en los Amerindios de Costa Rica" (N°742-93-903) and the project N° 742-90-416 of the University of Costa Rica. The research was supported by Gobierno de Extremadura, Consejería de Empleo, Empresa e Innovación, and Fondo Social Europeo (FSE) fellowship PD10199 (MEGN) and a grant from AEXCID 13IA002. The project was coordinated in the CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics (RIBEF): Graciela E. Moya (Buenos Aires, Argentina), Eduardo Tarazona-Santos (Belo Horizonte, Brazil), Alba P. Sarmiento (Bogotá, Colombia), Ramiro Barrantes (San José, Costa Rica), Idania Rodeiro, Luis R. Calzadilla (La Habana, Cuba), Enrique Terán (Quito, Ecuador), Rocío Ortiz-López (Nuevo León, México), Marisol López-López (Mexico City, Mexico), Martha G. Sosa-Macías (Durango, Mexico), Ronald Ramírez-Roa (León, Nicaragua), Manuela Grazina (Coimbra, Portugal), Adrián Llerena (Badajoz, Spain), Francisco E. Estévez-Carrizo (Montevideo, Uruguay).

## RESUMEN

**Antecedentes étnicos y polimorfismo genético del *CYP2D6* en los costarricenses.** El Consorcio de la Red Iberoamericana de Farmacogenética CEIBA.FP ha demostrado que existen diferencias en cuanto a *CYP2D6* en las poblaciones latinoamericanas. Sin embargo, hasta ahora, se sabe poco de este gen de importancia farmacogenética en la población de Costa Rica, la cual tiene una ancestría trihíbrida. El presente estudio tiene como objetivos: determinar la frecuencia de los fenotipos extrapolados de *CYP2D6* en una población costarricense y determinar si existen diferencias en cuanto a las frecuencias de metabolizadores lentos (PMs) y ultra-rápidos (UMs) entre tres grupos con distinto origen étnico. Adicionalmente, las frecuencias de PMs y UMs obtenidas en este estudio fueron comparadas

con datos de poblaciones iberoamericanas. Por último, se pretende describir las frecuencias alélicas en los distintos grupos. En el estudio se incluyeron 385 muestras de individuos: 139 mestizos, 197 amerindios y 49 afro-caribeños. Los genotipos *CYP2D6* fueron determinados por XL-PCR y PCR tiempo real. Se determinaron las variantes alélicas \*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35 y \*41. Para la población total estudiada las frecuencias de PMs y UMs fueron respectivamente 6% y 6.5%. El porcentaje de individuos UMs fue mayor en la población mestiza que en la amerindia. La frecuencia de UMs varió de 3.6 a 10.1% y la de PMs de 1.4 a 10.1% en los grupos costarricenses. Las frecuencias más altas de UMs (10.1%) y de PMs (10.2%) se encontraron respectivamente en las poblaciones mestiza y amerindia. En conclusión, las frecuencias de UMs y PMs de *CYP2D6* varían ampliamente en las poblaciones mestiza, amerindia y afro-caribeña de Costa Rica. Investigaciones futuras en la población de Costa Rica deberían orientarse a identificar nuevas variantes del *CYP2D6* mediante métodos de secuenciación, así como a determinar el fenotipo de *CYP2D6* con el objetivo de establecer la relación fenotipo-genotipo. Finalmente, es necesario realizar estudios adicionales que involucren marcadores genéticos de ancestría en la población costarricense.

**Palabras clave:** *CYP2D6*, Costa Rica, amerindios, afro-caribeños, mestizos, poblaciones, metabolizadores lentos, metabolizadores ultra-rápidos.

## REFERENCES

- Albuquerque, J., Ribeiro, C., Naranjo, M. E., Llerena, A., Grazina, M., & CEIBA.FP Consortium. (2013). Characterization of *CYP2D6* genotypes and metabolic profiles in the Portuguese population: pharmacogenetic implications. *Personalized Medicine*, 10(7), 709-718.
- Arias, T. D., Jorge, L., Lee, D., Guerrero de Solís, N., Escobar, J., Barrantes, R., & Inaba, T. (1986). Biotransformation of sparteine in the Cuna American Indians of Panama. *Revista médica de Panamá*, 11(3), 199-209.
- Arias, T. D., Jorge, L. F., Lee, D., Barrantes, R., & Inaba, T. (1988). The oxidative metabolism of sparteine in the Cuna Amerindians of Panama: absence of evidence for deficient metabolizers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 43(4), 456-465.
- Azofeifa, J., Hahn, M., Ruiz, E., Hummerich, L., Morales, A. I., Jiménez, G., & Barrantes, R. (2004). The STR polymorphism (AAAAAT)<sub>n</sub> within the intron 1 of the tumor protein 53 (TP53) locus in 17 populations of different ethnic groups of Africa, America, Asia and Europe. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 645-657.
- Bailliet, G., Santos, M. R., Alfaro, E. L., Dipierri, J. E., Demarchi, D. A., Carnese, F. R., & Bianchi, N. O. (2007). Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. *Mutation Research*, 627(2), 171-177.
- Barrantes, R., Smouse, P. E., Neel, J. V., Mohrenweiser, H. W., & Gershowitz, H. (1982). Migration and genetic infrastructure of the Central American Guaymí and their affinities with other tribal groups. *American Journal of Physical Anthropology*, 58(2), 201-214.
- Barrantes, R. (1989). Biodemografía de las poblaciones amerindias de Costa Rica. *Vínculos*, 15, 59-68.
- Barrantes, R., Smouse, P. E., Mohrenweiser, H. W., Gershowitz, H., Azofeifa, J., Arias, T. D., & Neel, J. V. (1990). Microevolution in lower Central America: genetic characterization of the Chibcha-speaking groups of Costa Rica and Panama, and a consensus taxonomy based on genetic and linguistic affinity. *American Journal of Human Genetics*, 46(1), 63-84.
- Barrantes, R. (1993a). Diversidad genética y mezcla racial en los amerindios de Costa Rica y Panamá. *Revista de Biología Tropical*, 41(3), 379-384.
- Barrantes, R. (1993b). Estructura de poblaciones. In *Evolución en el trópico: los amerindios de Costa Rica y Panamá* (pp. 51-85). San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Bieber, H., Bieber, S. W., Rodewald, A., & Barrantes, R. (1996). Microevolution and genetic affinities among six Amerindian tribes of lower Central America: comparative genetic study of serum proteins. *Human Biology*, 68(6), 929-953.
- Bradford, L. D. (2002). *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*, 3(2), 229-243.
- Casner, P. R. (2005). The effect of *CYP2D6* polymorphisms on dextromethorphan metabolism in Mexican Americans. *Journal of Clinical Pharmacology*, 45(11), 1230-1235.
- Crescenti, A., Mas, S., Gassó, P., Baiget, M., Bernardo, M., & Lafuente, A. (2007). Simultaneous genotyping of *CYP2D6*\*3, \*4, \*5 and \*6 polymorphisms in a Spanish population through multiplex long polymerase chain reaction and minisequencing multiplex single base extension analysis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(10), 992-997.
- Crews, K. R., Gaedigk, A., Dunnenberger, H. M., Klein, T. E., Shen, D. D., Callaghan, J. T., Kharasch, E. D., & Skaar, T. C. (2012). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for codeine therapy in the context of cytochrome P450 2D6 (*CYP2D6*) genotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 91(2), 321-326.
- CYP Alleles Nomenclature Database. (2013). *The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database*. Retrieved from <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>



- De Andrés, F., Sosa-Macias, M., Lazalde-Ramos, B. P., Naranjo, M. E. G., Tarazona-Santos, E., Llerena, A., & CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEFa. (2013). Evaluation of drug-metabolizing enzyme hydroxylation phenotypes in Hispanic populations: the CEIBA cocktail. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 28(3), 135-146. doi:10.1515/dmdi-2013-0020
- Dorado, P., Cáceres, M. C., Pozo-Guisado, E., Wong, M. L., Licinio, J., & Llerena, A. (2005). Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *BioTechniques*, 39(4), 571-574.
- Dorado, P., Heras, N., Machín, E., Hernández, F., Teran, E., & Llerena, A. (2012). CYP2D6 genotype and dextromethorphan hydroxylation phenotype in an Ecuadorian population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 68(5), 637-644.
- Estevez, F., Giusti, M., Parrillo, S., & Oxandabarat, J. (1997). Dextromethorphan O-demethylation polymorphism in the Uruguayan population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 52(5), 417-418.
- Fohner, A., Muzquiz, L. I., Austin, M. A., Gaedigk, A., Gordon, A., Thornton, T., Rieder, M. J., Pershouse, M. A., Putnam, E. A., Howlett, K., Beatty, P., Thummel, K. E., & Woodahl, E. L. (2013). Pharmacogenetics in American Indian populations: analysis of CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, and CYP2C9 in the Confederated Salish and Kootenai Tribes. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23(8), 403-414. doi:10.1097/FPC.0b013e3283629ce9
- Gaedigk, A., Bradford, L., Marcucci, K., & Leeder, J. (2002). Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 72(1), 76-89.
- Gaedigk, A., Simon, S. D., Pearce, R. E., Bradford, L. D., Kennedy, M. J., & Leeder, J. S. (2008). The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83(2), 234-242.
- Gaedigk, A., Isidoro-García, M., Pearce, R. E., Sánchez, S., García-Solaesa, V., Lorenzo-Romo, C., Gonzalez-Tejera, G., & Corey, S. (2010). Discovery of the nonfunctional CYP2D6 31 allele in Spanish, Puerto Rican, and US Hispanic populations. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66(9), 859-864.
- González, I., Peñas-Lledó, E. M., Pérez, B., Dorado, P., Alvarez, M., & Llerena, A. (2008). Relation between CYP2D6 phenotype and genotype and personality in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*, 9(7), 833-840.
- Griman, P., Moran, Y., Camargo, M., & Chiurillo, M. (2009). Caracterización de las variantes alélicas del citocromo CYP2D6 en la población de la región centroccidental de Venezuela. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 195-202.
- Griman, P., Moran, Y., Valero, G., Loreto, M., Borjas, L., & Chiurillo, M. A. (2012). CYP2D6 gene variants in urban/admixed and Amerindian populations of Venezuela: pharmacogenetics and anthropological implications. *Annals of Human Biology*, 39(2), 137-142.
- Herrmann, F., Salazar-Sánchez, L., Schuster, G., Jiménez-Arce, G., Grimm, R., Gómez, X., Chavez, V., & Schroder, W. (2002). Molecular markers in the genes for FV (FVL, FV HR2, FVIVS 16), MTHFR, prothrombin and ACE in Amerindians and Africans from Costa Rica. *Gene Diagnosis of Inherited Bleeding Disorders*, 203-220.
- Hicks, J. K., Swen, J. J., Thorn, C. F., Sangkuhl, K., Kharasch, E. D., Ellingrod, V. L., Skaar, T. C., Müller, D. J., Gaedigk, A., & Stügel, J. C. (2013). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 93(5), 402-408. doi:10.1038/clpt.2013.2
- Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal*, 5(1), 6-13.
- Isaza, C. A., Henao, J., López, A. M., & Cacabelos, R. (2000). Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 22(9), 695-705.
- Jorge, L. F., & Arias, T. D. (1995). Human biodiversity and its effects on the pharmacological variability: CYP2D6 and NAT2 enzymes in Amerind populations of Panama, Colombia and Costa Rica. *Revista Médica de Panamá*, 20(3), 98-107.
- Jorge, L. F., Eichelbaum, M., Griesse, E. U., Inaba, T., & Arias, T. D. (1999). Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*, 9(2), 217-228.
- Kohlrusch, F. B., Gama, C. S., Lobato, M. I., Belmonte-de-Abreu, P., Gesteira, A., Barros, F., Carracedo, A., & Hutz, M. H. (2009). Molecular diversity at the CYP2D6 locus in healthy and schizophrenic southern Brazilians. *Pharmacogenomics*, 10(9), 1457-1466.
- Llerena, A., Edman, G., Cobaleda, J., Benítez, J., Schalling, D., & Bertilsson, L. (1993). Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity. Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P4502D6. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 87(1), 23-28.

- Llerena, A., Dorado, P., & Peñas-Lledó, E. M. (2009). Pharmacogenetics of debrisoquine and its use as a marker for CYP2D6 hydroxylation capacity. *Pharmacogenomics*, 10(1), 17-28.
- Llerena, A., Dorado, P., Ramírez, R., González, I., Alvarez, M., Peñas-Lledó, E. M., Pérez, B., & Calzadilla, L. R. (2012). CYP2D6 genotype and debrisoquine hydroxylation phenotype in Cubans and Nicaraguans. *The Pharmacogenomics Journal*, 12(2), 176-183.
- Llerena, A., Dorado, P., Ramírez, R., Calzadilla, L. R., Peñas-Lledó, E., Alvarez, M., Naranjo, M. E., González, I., Pérez, B., & CEIBA Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics RIBEF. (2013). CYP2D6 -1584C>G promoter polymorphism and debrisoquine ultrarapid hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*, 14(16), 1973-1977. doi:10.2217/pgs.13.181
- López, M., Guerrero, J., Jung-Cook, H., & Alonso, M. E. (2005). CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 61(10), 749-754.
- Lovlie, R., Daly, A. K., Molven, A., Idle, J. R., & Steen, V. M. (1996). Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Letters*, 392(1), 30-34.
- Luo, H. R., Gaedigk, A., Aloumanis, V., & Wan, Y. J. Y. (2005). Identification of CYP2D6 impaired functional alleles in Mexican Americans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 61(11), 797-802.
- Madrigal, L. (2006). The Afro-Caribbean population in Limón, Costa Rica. In *Human Biology of Afro-Caribbean populations* (pp. 176-185). New York, USA: Cambridge University Press.
- Mendoza, R., Wan, Y. J., Poland, R. E., Smith, M., Zheng, Y., Berman, N., & Lin, K. M. (2001). CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70(6), 552-560.
- Montané-Jaime, L. K., Lalla, A., Steimer, W., & Gaedigk, A. (2013). Characterization of the CYP2D6 gene locus and metabolic activity in Indo- and Afro-Trinidadians: discovery of novel allelic variants. *Pharmacogenomics*, 14(3), 261-276. doi:10.2217/pgs.12.207
- Morera, B., Barrantes, R., & Marin-Rojas, R. (2003). Gene admixture in the Costa Rican population. *Annals of Human Genetics*, 67(1), 71-80.
- Morera, B., & Barrantes, R. (2004). Is the Central Valley of Costa Rica a genetic isolate? *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 629-644.
- Muñoz, S., Vollrath, V., Vallejos, M. P., Miquel, J. F., Covarrubias, C., Raddatz, A., & Chianale, J. (1998). Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics*, 8(4), 343-351.
- Peñas-Lledó, E. M., Dorado, P., Pacheco, R., González, I., & Llerena, A. (2009). Relation between CYP2D6 genotype, personality, neurocognition and overall psychopathology in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*, 10(7), 1111-1120.
- Peñas-Lledó, E. M., Dorado, P., Agüera, Z., Gratacós, M., Estivill, X., Fernández-Aranda, F., & Llerena, A. (2012). CYP2D6 polymorphism in patients with eating disorders. *The Pharmacogenomics Journal*, 12(2), 173-175.
- Reich, D., Patterson, N., Campbell, D., Tandon, A., Mazieres, S., Ray, N., Parra, M. V., Rojas, W., Duque, C., Mesa, N., Garcia, L. F., Triana, O., Blair, S., Maestre, A., Dib, J. C., Bravi, C. M., Bailliet, G., Corach, D., Hünemeier, T., Bortolini, M. C., Salzano, F. M., Petzl-Erler, M. L., Acuña-Alonzo, V., Aguilar-Salinas, C., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, T., Riba, L., Rodríguez-Cruz, M., López-Alarcón, M., Coral-Vázquez, R., Canto-Cetina, T., Silva-Zolezzi, I., Fernández-López, J. C., Contreras, A. V., Jiménez-Sánchez, G., Gómez-Vázquez, M. J., Molina, J., Carracedo, A., Salas, A., Gallo, C., Poletti, G., Witonsky, D. B., Alkorta-Aranburu, G., Sukernik, R. I., Osipova, L., Fedorova, S. A., Vasquez, R., Villena, M., Moreau, C., Barrantes, R., Pauls, D., Excoffier, L., Bedoya, G., Rothhammer, F., Dugoujon, J. M., Larrouy, G., Klitz, W., Labuda, D., Kidd, J., Kidd, K., Di Rienzo, A., Freimer, N. B., Price, A. L., & Ruiz-Linares, A. (2012). Reconstructing Native American population history. *Nature*, 488(7411), 370-374.
- Rodeiro, I., Remírez-Figuero, D., García-Mesa, M., Dorado, P., Llerena, A., & CEIBA.FP Consortium of the Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics RIBEF. (2012). Pharmacogenetics in Latin American populations: regulatory aspects, application to herbal medicine, cardiovascular and psychiatric disorders. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 27(1), 57-60.
- Ruiz-Narváez, E. A., Santos, F. R., Carvalho-Silva, D. R., Azofeifa, J., Barrantes, R., & Pena, S. D. J. (2005). Genetic variation of the Y chromosome in Chibcha-speaking Amerindians of Costa Rica and Panama. *Human Biology*, 77(1), 71-91.
- Sans, M. (2000). Admixture studies in Latin America: from the 20th to the 21st century. *Human Biology*, 72(1), 155-177.
- Santos, M., Ward, R. H., & Barrantes, R. (1994). mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Human Biology*, 66(6), 963-977.
- Segura-Wang, M., Raventós, H., Escamilla, M., & Barrantes, R. (2010). Assessment of genetic ancestry and population substructure in Costa Rica by analysis of

- individuals with a familial history of mental disorder. *Annals of Human Genetics*, 74(6), 516-524.
- Silveira, V. D. S., Canalle, R., Scrideli, C. A., Queiroz, R. G. de P., & Tone, L. G. (2009). Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes in a Brazilian population. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 14(2), 111-117.
- Sosa-Macias, M., Elizondo, G., Flores-Pérez, C., Flores-Pérez, J., Bradley-Alvarez, F., Alanis-Bañuelos, R. E., & Lares-Asseff, I. (2006). CYP2D6 genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, Mexico. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46(5), 527-536.
- Sosa-Macias, M., Dorado, P., Alanis-Bañuelos, R. E., Llerena, A., & Lares-Asseff, I. (2010). Influence of CYP2D6 deletion, multiplication, -1584C-->G, 31G-->A and 2988G-->A gene polymorphisms on dextromethorphan metabolism among Mexican tepehuanos and mestizos. *Pharmacology*, 86(1), 30-36.
- Thompson, E. A., Neel, J. V., Smouse, P. E., & Barrantes, R. (1992). Microevolution of the Chibcha-speaking peoples of lower Central America: rare genes in an Amerindian complex. *American Journal of Human Genetics*, 51(3), 609-626.
- Wang, S., Lewis, C. M., Jakobsson, M., Ramachandran, S., Ray, N., Bedoya, G., Rojas, W., Parra, M. V., Molina, J. A., Gallo, C., Mazzotti, G., Poletti, G., Hill, K., Hurtado, A. M., Labuda, D., Klitz, W., Barrantes, R., Bortolini, M. C., Salzano, F. M., Petzl-Erler, M. L., Tsuneto, L. T., Llop, E., Rothhammer, F., Excoffier, L., Feldman, M. W., Rosenberg, N. A., & Ruiz-Linares, A. (2007). Genetic variation and population structure in native Americans. *PLoS Genetics*, 3(11), e185.
- Wang, S., Ray, N., Rojas, W., Parra, M. V., Bedoya, G., Gallo, C., Poletti, G., Mazzotti, G., Hill, K., Hurtado, A. M., Camrena, B., Nicolini, H., Klitz, W., Barrantes, R., Molina, J. A., Freimer, N. B., Bortolini, M. C., Salzano, F. M., Petzl-Erler, M. L., Tsuneto, L. T., Dipierri, J. E., Alfaro, E. A., Bailliet, G., Bianchi, N. O., Llop, E., Rothhammer, F., Excoffier, L., & Ruiz-Linares, A. (2008). Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genetics*, 4(3), e1000037.