

Actividad antimutagénica de *Salvia hispanica* sobre mutaciones y recombinaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*²

Gayozo, E.¹; Rivarola, C.¹; Marín Insfrán, L.¹; Filizzola, N.¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción

²Trabajo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, financiado por el Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción durante el año 2015

E mail del autor: elviologo@gmail.com

Actividad antimutagénica de *Salvia hispanica* sobre mutaciones y recombinaciones somáticas en *Drosophila melanogaster*. Actualmente el consumo de Chía (*Salvia hispanica*) en Paraguay ha aumentado en zonas urbanas y rurales principalmente como suplemento nutricional e importante fuente antioxidante. Investigaciones demuestran que metabolitos secundarios aislados de plantas del género *Salvia* poseen actividades antioxidantes y podrían ser antimutagénicas. Este estudio corresponde a un modelo experimental analítico puro de corte transversal con diseño completamente al azar y tiene por objetivo determinar la acción antimutagénica del mucilago de *Salvia hispanica* en *Drosophila melanogaster*. Para esto, larvas de tercer estadio se sometieron a tratamiento oral por 6 horas con Ciclofosfamida para inducir mutaciones, luego fueron expuestas por 46 horas a diferentes concentraciones del mucilago de semillas de *S. hispanica* acorde al uso popular (11,5 mg.mL⁻¹, 17,1 mg.mL⁻¹ y 22,9 mg.mL⁻¹). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente con el test de Kastenbaum-Bowman; $\alpha = \beta = 0,05$ y revelaron disminución de entre 18% a 45% en la frecuencia total de mutaciones.

Palabras claves: antigenotoxicidad, Chía, *D. melanogaster*, Mutaciones, Paraguay

Antimutagenic activity of *Salvia hispanica* on somatic mutations and recombinations in *Drosophila melanogaster*. Currently the consumption of Chia (*Salvia hispanica*) in Paraguay has increased in urban and rural areas mainly as a nutritional supplement and important antioxidant source. Research shows that secondary metabolites isolated from plants of the genus *Salvia* possess antioxidant activity and could be antimutagenic. This study corresponds to a pure analytical experimental cross-section model with a completely randomized design, and it aims to determine the antimutagenic action of the mucilage of *Salvia hispanica* in *Drosophila melanogaster*. For this purpose, third-instar larvae were treated orally with Cyclophosphamide for 6 hours to induce mutations, then exposed for 46 hours to different concentrations of *S. hispanica* mucilage according to popular usage (11.5 mg.mL⁻¹, 17.1 mg.mL⁻¹ and 22.9 mg.mL⁻¹). The results were statistically analyzed with the Kastenbaum-Bowman test $\alpha = \beta = 0.05$, and showed an 18% to 45% decrease in total frequency of mutations.

Keywords: antigenotoxicity, Chia, *D. melanogaster*, mutations, Paraguay

INTRODUCCIÓN

La Chía (*Salvia hispanica*) es una hierba anual de la familia Lamiaceae, posee semillas con altos contenidos lipídicos (65% de aceite) siendo Ω -3- α -ácido linolénico (63%) y Ω -6-ácido

linoléico (19%) los más abundantes del total de lípidos, 20% de contenido proteico y 5-10% de fibras en el mucilago, esto representa un rendimiento superior en comparación a otras fuentes naturales y hace de los mismos muy empleados en la dieta tanto con fines nutricionales como

Steviana, Vol. 8(1), 2016 pp. 50– 58.

Original recibido el 27 de junio de 2016.

Aceptado el 14 de octubre de 2016.

con fines terapéuticos (Ullah *et al.*, 2015; Ayerza *et al.*, 2002; Ayerza y Coates, 2011; Di Sapio *et al.*, 2008; Cvetkovikj *et al.*, 2013; Alfredo *et al.*, 2009).

Son ampliamente utilizadas como fuente de antioxidantes, a consecuencia de su contenido en polifenoles (8,8% del peso seco), este grupo de compuestos posee la capacidad proteger del deterioro oxidativo e inhibir la acción de los radicales libres, la presencia de estas moléculas se cree podría poseer efectos neuroprotectores, antihipertensivo, antienvjecimiento y anticarcinógenos (Tepe *et al.*, 2006; Ullah *et al.*, 2015; Craig, 2004).

El poder antioxidante de los mismos fue evaluado *in vitro* empleando ensayos como el sistema de peroxidación de liposomas, el sistema modelo del ácido linoleico β -caroteno (B-CLAMS) y sistema del radical catiónico del ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS+radical), evidenciando de esta manera que los mismos pueden actuar de manera similar a antioxidantes comerciales (Valdivia-López y Tecante, 2015; Reyes-Caudillo *et al.*, 2008). Es importante destacar que polifenoles también fueron encontrados asociados a fibras presentes en la goma (mucilago) secretada por las semillas, por lo que posee también ligeras actividades antioxidantes (Valdivia-López y Tecante, 2015).

Aceites extraídos de semillas fueron introducidas a la dieta diaria de ratas obesas restauraron el sistema antioxidante en ellos, otro estudio sugiere que la combinación de estas con extracto de frutos de *Punica granatum* podría utilizarse para el tratamiento de melanomas epidérmicos, ya que estos pueden interrumpir las síntesis de melanina

(da Silva *et al.*, 2015; Diwakar *et al.*, 2014).

El presente estudio tiene por objetivo determinar la acción antimutagénica del mucilago secretado por las semillas de *Salvia hispanica* sobre mutaciones y recombinaciones inducidas químicamente en *Drosophila melanogaster*, a fin de comprobar la antigenotoxicidad del mismo en sistemas *in vivo* a modo de obtener resultados consistentes para sistemas vivos (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto acuoso del mucilago de *Salvia hispanica*

Las semillas de *Salvia hispanica* fueron obtenidas de proveedores comerciales e identificados según los caracteres morfológicos descritos por Di Sapio y colaboradores (2012). Se pesaron 11,5 g, 17,1 g y 22,9 g respectivamente y fueron lavadas con agua destilada a manera de liberar la carga de contaminantes y activar uniformemente la secreción del mucilago a temperatura ambiente constante de $28 \pm 1^\circ$ C (Muñoz *et al.*, 2012). Se dejaron reposar cada uno en 1000 mL de agua destilada por 8 horas según el consumo popular paraguayo.

Luego de transcurrido el tiempo de reposo, se procedió al filtrado con una malla de 0,5 mm de diámetro y se obtuvieron tres soluciones de $11,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $17,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $22,9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Test de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster*

Se utilizó la metodología propuesta por Graf *et al* (1998), para lo cual se realizaron cruces estándar entre 100 hembras

vírgenes de la cepa *flr³/In(3LR) TM3, rip^p sep I(3)89Aa bx^{34e} y Bd^S* y 50 machos de la cepa *mwh/mwh*, se depositaron en proporción de dos hembras por cada macho y se colocaron en medio ovopositor (Graf et al., 1984; Deepa Parvathi et al., 2011).

Se seleccionaron al azar un total de 500 larvas de tercer estadio que fueron separadas en 100 larvas para cada tratamiento. De las cuales 400 fueron expuestas a tratamiento agudo durante 6 horas con el mutágeno (0,3 g celulosa microcristalina Avicel® PH 102 rehidratado con 1,5 mL de Ciclofosfamida

2,61 mg.mL⁻¹) para inducir a mutaciones, 100 larvas fueron tratadas por 6 horas con agua destilada como control (0,3 g de celulosa microcristalina Avicel® PH 102 rehidratado con 1,5 mL de agua destilada). Transcurridas 6 horas de tratamiento agudo, las larvas fueron lavadas con agua destilada a modo de deshacer restos del mutágeno y fueron transferidas a medios que contenían las diluciones del mucilago durante 46 horas, estos fueron divididos en 5 postratamientos (1,5 g de puré de papa instantáneo rehidratados con diluciones especificadas en la **Tabla 1**).

Tabla 1: Diseño de los tratamientos

Unidad Experimental	Número de larvas utilizadas	Postratamientos	Tratamientos
T1	100 ^A	5 mL de agua destilada	T1: Agua destilada (Control)
T2	100 ^B	5 mL de agua destilada	T2: Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹
T3	100 ^B	5 mL de 11,5 mg. mL ⁻¹	T3: Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹ + 11,5 mg.mL ⁻¹
T4	100 ^B	5 mL de 17,1 mg. mL ⁻¹	T4: Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹ + 17,1 mg.mL ⁻¹
T5	100 ^B	5 mL de 22,9 mg. mL ⁻¹	T5: Ciclofosfamida 2,61 mg.mL ⁻¹ + 22,9 mg/mL ⁻¹

^A Tratamiento previo con agua destilada por 6 horas.

^B Tratamiento previo con Ciclofosfamida 2,61 mg.mL⁻¹ por 6 horas.

Transcurridos 72 horas luego del postratamiento, se seleccionaron al azar individuos adultos trans-heterocigotos *mwh+/+flr³* de los cuales se extrajeron las alas y se montaron en láminas con ayuda de la solución de Faüre (Goma arábica 300 g, Glicerol 20 mL, Hidrato de Cloral 50 g, y Agua destilada 50 mL). Las observaciones se realizaron a un aumento de 400X con microscopios ópticos

Motic®. Se analizaron las secciones A, B, C', C, D', D y E de cada ala, incluyendo los márgenes que separan estas regiones según las recomendaciones de Rodrigues de Andrade et al (2004).

Se mantuvieron los criterios sugeridos por Graf et al (1984) para la clasificación de los clones mutantes, según su clase y tamaño en manchas pequeñas simples (MSP) que incluyen una o dos células

mutadas (*mwh* o *flr*³); manchas simples grandes (MSG) con más de 3 células mutadas (*mwh* o *flr*³) y manchas gemelas (MG) con un área *mwh* y otra *flr*³ adyacentes.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante tablas estadísticas de acuerdo con Frei y Würzler (1988) que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman) $\alpha=\beta=0,05$ (Kastenbaum y Bowman, 1970). Los gráficos estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6.00, La Jolla California USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron encontradas un total de 11 clones mutantes en las alas de individuos tratados con Ciclofosfamida 2,61 mg.mL⁻¹ y 3 clones en el control, siendo la frecuencia de los mismos 1,10 y 0,30 respectivamente. Se contabilizaron 7 clones en total para el postratamiento con 11,5 mg.mL⁻¹, 6 clones mutantes para el tratamiento con 17,1 mg.mL⁻¹, el cual fue de menor cantidad, y 9 clones para el tratamiento con 22,9 mg.mL⁻¹, los cuales presentaron frecuencias de 0,70, 0,60 y 0,90 respectivamente. Se identificaron todos los tipos de clones mutantes (MSP, MSG y MG) en las alas observadas (Fig. 1).

La frecuencia de aparición de clones MSP para el tratamiento con el mutágeno y el control fueron 0,80 y 0,20 respectivamente. Sin embargo, en el tratamiento con 17,1 mg.mL⁻¹ disminuyó su frecuencia de aparición a 0,40 siendo este el que presentó mayor reducción. No obstante, solo existió una pequeña

reducción para los tratamientos con 11,5 mg.mL⁻¹ y 22,9 mg/mL⁻¹ siendo 0,60 para ambos, es importante destacar que estas disminuciones no fueron significativas.

La cuantificación de clones del tipo MSG no arrojó diferencias significativas en las frecuencias de aparición de las mismas. En los tratamientos con 17,1 mg.mL⁻¹ y 22,9 mg/mL⁻¹ no existió reducción alguna, siendo 0,20 la frecuencia de estas, solo se observó una pequeña disminución en el tratamiento con 11,5 mg.mL⁻¹ con una frecuencia igual a 0,10. Clones mutantes del tipo MG, evidenciaron una reducción total en la frecuencia para los tratamientos con 11,5 mg.mL⁻¹ y 17,1 mg.mL⁻¹, sin embargo, no se observó efecto alguno en el tratamiento con 22,9 mg/mL⁻¹ siendo la frecuencia de esta igual a la tratada con el mutágeno.

Las frecuencias del total de mutaciones (TM) disminuyeron considerablemente en todos los tratamientos, ocurriendo la mayor reducción en los tratamientos con 11,5 mg.mL⁻¹ y 17,1 mg.mL⁻¹ siendo estas del 36,37% y 45,46%. No obstante, la menor efectividad fue observada en el tratamiento con 22,9 mg.mL⁻¹ siendo esta del 18,19% (Tabla 2; Fig. 2).

La disminución de las mutaciones podría explicarse por tres mecanismos posibles, el primero es la interferencia sobre lesiones inducidas en el material genético, esto podría ocurrir por la acción que se genera sobre enzimas encargadas de la desintoxicación de mutágenos, la segunda alternativa posible es que compuestos presentes en el mucílago intervenga sobre mecanismos de reparación del material genético una vez fijados los daños ocasionados por el mutágeno (Pimentel y Cruces, 2006; Arrebola *et al.*, 2009). El tercer evento

posible es que se haya desencadenado mecanismos apoptóticos en las células afectadas por el mutágeno, esto podría ser posible gracias a compuestos como el ácido eicosapentaenoico (EPA) que es capaz de estimular la acción de caspasas y generar la apoptosis en células tumorales y ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (ω -3 PUFAs) que tiene la misma capacidad de desencadenar el fenómeno de apoptosis, esto pudo observarse también en líneas celulares cancerígenas humanas (Espada *et al.*, 2007; Schley *et al.*, 2005).

El mucilago secretado por semillas de *S. hispanica* poseen pequeñas fracciones polifenólicas como ácidos fenólicos, isoflavonas y antocianinas, también se encontraron mayoritariamente en semillas compuestos polifenólicos y flavonoles como el ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol, los cuales podrían también poseer actividades antígenotóxicas o anticarcinógenas (Valdivia-López y Tecante, 2015; Oliveira *et al.*, 2010; Alfredo *et al.*, 2009; Podsędek, 2007; Asadi *et al.*, 2010; Kada *et al.*, 1985).

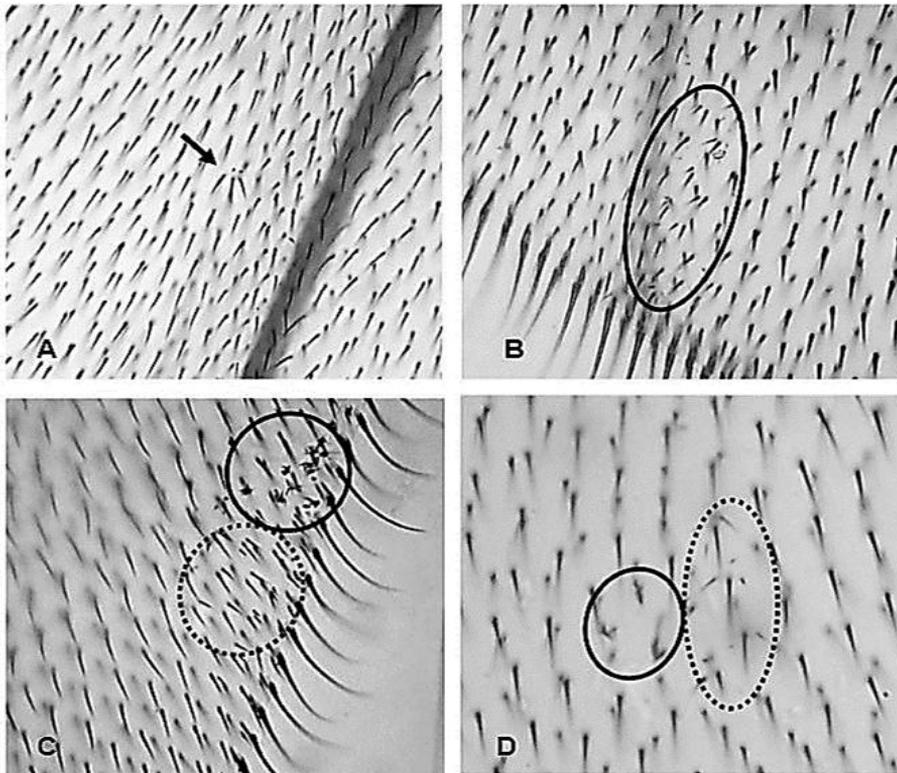


Fig. 1: Clones encontrados en alas de *Drosophila melanogaster* en postratamiento con el extracto acuoso de *Salvia hispanica*, **A.** Mancha Simple Pequeña (MSP) del tipo MWH (flecha), **B.** Mancha Simple Grande (MSG) del tipo *mwh* (círculo de línea sólida), **C-D.** Mancha Gemela (MG) del tipo *mwh* (círculo de línea punteada) y manchas de tipo *flr³* (círculo de línea sólida).

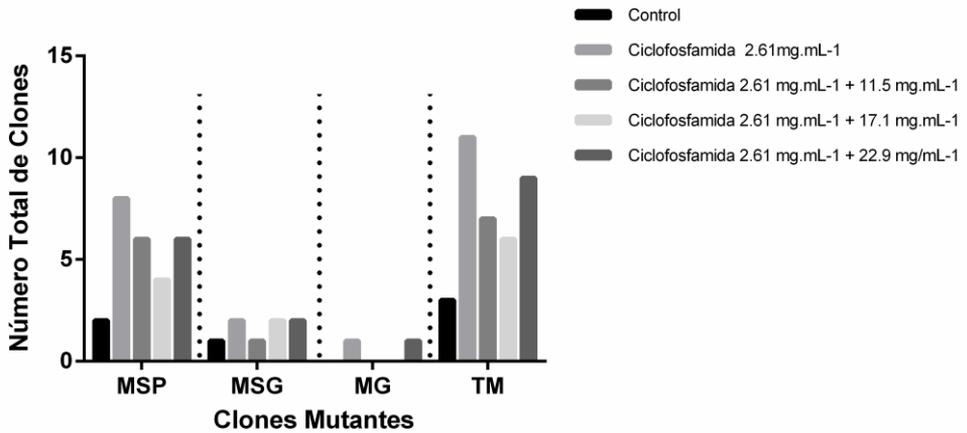


Fig. 2: Número total de clones mutantes encontrados en las alas de *Drosophila melanogaster*.

Tabla 2: Análisis estadístico del potencial antimutagénico del mucilago de *S. hispanica* en individuos *mwh+ / +flr³*.

Tratamiento	Cantidad de alas	MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	Inhibición (%)
T1	20	0,20 (02)	0,10 (01)	0,00 (00)	0,30 (03)	—
T2	20	0,80 (08) i	0,20 (02) i	0,10 (01) i	1,10 (11) +	—
T3	20	0,60 (06) i	0,10 (01) i	0,00 (00) i	0,70 (07) i	36,37
T4	20	0,40 (04) i	0,20 (02) i	0,00 (00) i	0,60 (06) i	45,46
T5	20	0,60 (06) i	0,20 (02) i	0,10 (01) i	0,90 (09) i	18,19

a. Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia $\alpha = \beta = 0,05$; b. Incluso las manchas simples *flr³* raras; c. Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos evidencian que el mucilago, secretado por las semillas de *Salvia hispanica*, posee potencial antimutagénico ya que a distintas concentraciones del extracto acuoso del mismo han disminuido el número de mutaciones inducidas en los individuos trans-heterocigotas *mwh+ / +flr³* de *Drosophila melanogaster* en comparación

con aquellas tratadas solos con el mutágeno (Ciclofosfamida). Tales resultados sustentan lo descrito por Alfredo et al (2009) y Asadi et al (2010), quienes demostraron las actividades antioxidantes del mucilago frente a distintos tipos de compuestos capaces de generar radicales libres o inducir mutaciones.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones: Universidad Nacional de Asunción, por el financiamiento de esta investigación a través de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (DGICT) y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN) por la ayuda y facilidades ofrecidas para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Alfredo, V.O.; Gabriel, R.R.; Luis, C.G.; David, B.A. 2009. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT-Food Science and Technology* 42(1): 168-173. doi: 10.1016/j.lwt.2008.05.012
- Arrebola, D.F.A.; Fernández, L.A.R.; Feria, Y. L.; Rivero, D.D. 2009. Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Revista de toxicología en línea* 21: 37-51.
- Asadi, S.; Ahmadiani, A.; Esmaeili, M. A.; Sonboli, A.; Ansari, N.; Khodagholi, F. 2010. In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study. *Food and chemical toxicology* 48(5): 1341-1349. doi: 10.1016/j.fct.2010.02.035
- Ayerza, R.; Coates, W. 2011. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chía (*Salvia hispanica* L.). *Industrial Crops and Products* 34(2): 1366-1371. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.12.007
- Ayerza, R.; Coates, W.; Lauria, M. 2002. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poultry Science* 81(6): 826-837. doi: 10.1093/ps/81.6.826
- Cvetkovikj, I.; Stefkov, G.; Acevska, J.; Stanoeva, J. P.; Karapandzova, M.; Stefova, M.; Dimitrovska, A.; Kulevanova, S. 2013. Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assessment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *Journal of Chromatography A* 1282: 38-45. doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.068
- Da Silva M., R.; Moura, C.S.; Moraes, E. A.; Lenquiste, S.A.; Lollo, P.C.B.; Morato, P.N.; Amaya-Farfan, J.; Maróstica, M. R. 2015. Chia (*Salvia hispanica* L.) enhances HSP, PGC-1 α expressions and improves glucose tolerance in diet-induced obese rats. *Nutrition* 31(5): 740-748. doi: 10.1016/j.nut.2014.11.009
- Deepa Parvathi, V.; Akshaya Amritha, S.; Mathangi, R.; Swarna R.; Solomon, F. 2011. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Advanced Biotech* 10(3): 22-24.
- Diwakar, G.; Rana, J.; Saito, L.; Vredeveld, D.; Zemaitis, D.; Scholten, J. 2014. Inhibitory effect of a novel combination of *Salvia hispanica* (chia) seed and *Punica granatum* (pomegranate) fruit extracts on melanin production. *Fitoterapia* 97: 164-171. doi: 10.1016/j.fitote.2014.05.021

- Di Sapio, O.; Bueno, M.; Busilacchi, H.; Severin, C. 2008. Chía: importante antioxidante vegetal. *Agromensajes de la Facultad* 56: 11-13.
- Di Sapio, O.; Bueno, M.; Busilacchi, H.; Quiroga, M.; Severin, C. 2012. Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(3): 249-268.
- Espada, C.E.; Berra, M.A.; Martinez, M.J.; Eynard, A.R.; Pasqualini, M.E. 2007. Effect of Chia oil (*Salvia hispanica*) rich in ω -3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77(1): 21-28. doi: 10.1016/j.plefa.2007.05.005
- Fernandez-Panchon, M.S.; Villano, D.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parrilla, M.C. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(7): 649-671. doi: 10.1080/10408390701761845
- Frei, H.; Würgler, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203(4): 297-308. doi: 10.1016/0165-1161(88)90019-2
- Graf, U.; Würgler, F.E.; Katz, A.J.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C.B.; Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 6 (2):153-188. doi: 10.1002/em.2860060206
- Graf, U.; Abraham, S.K.; Guzmán-Rincón, J.; Würgler, F.E. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 402(1): 203-209. doi: 10.1016/S0027-5107(97)00298-4
- Kada, T.; Kaneko, K.; Matsuzaki, S.; Matsuzaki, T.; Hora, Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: a case of the green tea factor. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 150(1): 127-132. doi: 10.1016/0027-5107(85)90109-5
- Kastenbaum, M.A.; Bowman, K.O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 9(5): 527-549. doi:10.1016/0027-5107(70)90038-2
- Muñoz, L.A.; Cobos, A.; Diaz, O.; Aguilera, J.M. 2012. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of food Engineering* 108(1): 216-224. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.06.037
- Oliveira, T.B.; Salazar, K.A.A.; Da Silveira Duarte, S.M.; Moreira, D.A.C.; De Paula, F. B. A. 2010. Avaliação da atividade antioxidante e antimutagênica do polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) *in vivo*. *Revista brasileira de análises clínicas* 42(4): 297-301.
- Pimentel-Peñaloza, A.E.; Cruces-Martínez, M. P. 2006. Acción modificadora de la

- Clorofilina de daño genético. *Contacto nuclear* 43:15-18.
- Podsędek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology* 40(1): 1-11. doi: 10.1016/j.lwt.2005.07.023
- Reyes-Caudillo, E.; Tecante, A.; Valdivia-López, M.A. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry* 107(2): 656-663. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.062
- Rodrigues De Andrade, H.H.; Reguly, M. L.; Lehmann, M. 2004. Wing somatic mutation and recombination test. En *Drosophila Cytogenetics Protocols*, Ed. D. S. Henderson, 389-412. Humana Press. Totowa. New Jersey.
- Schley, P.D.; Jijon, H.B.; Robinson, L.E.; Field, C.J. 2005. Mechanisms of omega-3 fatty acid-induced growth inhibition in MDA-MB- 231 human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 92(2):187-195. doi: 10.1007/s10549-005-2415-z
- Segura-Campos, M.R.; Salazar-Vega, I.M.; Chel-Guerrero, L. A.; Betancur-Ancona, D.A. 2013. Biological potential of chia (*Salvia hispanica* L.) protein hydrolysates and their incorporation into functional foods». *LWT-Food Science and Technology* 50(2): 723-731. doi: 10.1016/j.lwt.2012.07.017
- Valdivia-López, M.Á.; Tecante, A. 2015. Chia (*Salvia hispanica*): A Review of Native Mexican Seed and its Nutritional and Functional Properties. *Advances in food and nutrition research* 75: 53-75. doi: 10.1016/bs.afnr.2015.06.002