

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta
dissertação será disponibilizado
a partir de 24/02/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PPROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GIULLIA CAVICCHIOLI BARBOSA

**COMPOSTOS BIOATIVOS DE ALIMENTOS E A PROMOÇÃO
DA RESPOSTA ANTITUMORAL NO CÂNCER DE CÓLON:**

Uma análise *in vitro* sobre regimes de imuno e quimioterapia.

Botucatu

2026

GIULLIA CAVICCHIOLI BARBOSA

COMPOSTOS BIOATIVOS DE ALIMENTOS E A PROMOÇÃO DA RESPOSTA ANTITUMORAL NO CÂNCER DE CÓLON:

Uma análise *in vitro* sobre regimes de imuno e quimioterapia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Instituto de Biociências de Botucatu como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Guilherme Ribeiro Romualdo

Botucatu

2026

B238c Barbosa, Giullia

Compostos Bioativos de alimentos e a promoção da resposta antitumoral no câncer de cólon: Uma análise in vitro sobre regimes de imuno e quimioterapia / Giullia Barbosa. -- Botucatu, 2026

83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Guilherme Ribeiro Romualdo

1. isotiocianatos. 2. compostos bioativos. 3. câncer colorretal. 4. in vitro. 5. esferoides. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GIULLIA CAVICCHIOLI BARBOSA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 24 de fevereiro de 2026, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GIULLIA CAVICCHIOLI BARBOSA, intitulada " Compostos Bioativos de alimentos e a promoção da resposta antitumoral no câncer de cólon: Uma análise in vitro sobre regimes de imuno e quimioterapia". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. GUILHERME RIBEIRO ROMUALDO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) UNIPEX e PPG em Patologia / FMB/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. CLAUDIA HELENA PELLIZZON (Participação Virtual) do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB, Dr. TONY FERNANDO GRASSI (Participação Virtual) do Departamento de Anestesiologia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final **APROVADA**. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME RIBEIRO ROMUALDO**
Data: 24/02/2026 16:50:21-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. GUILHERME RIBEIRO ROMUALDO

AGRADECIMENTOS

A HISTÓRIA DO NAVIO

Dizem que um capitão assumiu o comando de um navio e iniciou uma travessia importante com sua tripulação. No meio do caminho, alguns deixaram seus postos. O mar não espera. Outros precisaram trabalhar dobrado, e o capitão assumiu a responsabilidade de manter o rumo.

O navio chegou ao destino.

E todos receberam a recompensa pela viagem concluída — inclusive aqueles que deixaram seus postos, independentemente do motivo — porque o capitão e o restante da tripulação decidiram assumir o peso da travessia até o fim.

Só depois se soube que, se aquela viagem tivesse dado errado justamente por causa dos que abandonaram seus postos, o capitão pagaria o preço. Ele era, em parte, refém das escolhas de outros — e talvez nunca mais tivesse a chance de comandar outro navio.

Mas o mar sempre traz novas travessias.

E, na próxima, cada um saberá exatamente onde escolheu estar quando as ondas apertaram — porque toda viagem ensina quem segura o leme e quem solta a corda.

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro recebido durante a realização do trabalho: Guilherme R. Romualdo recebeu bolsa e auxílio FAPESP (22/06082-8 e 23/08751-7), enquanto Giullia C. Barbosa e Agnes S. Varicoda receberam bolsas de mestrado e iniciação científica FAPESP (24/09284-6 e 24/06431-8), respectivamente. Os financiadores não tiveram qualquer influência na condução dos experimentos ou na preparação do manuscrito. O orientador gostaria de especialmente agradecer as alunas Agnes S. Varicoda (atual mestranda) e Letícia C. Valente (doutoranda), que foram essenciais para a conclusão

dos experimentos aqui descritos, assim como os demais membros do Laboratório de Oncologia e Toxicologia Translacional (OncoToxLab). Também gostaríamos de agradecer aos Profs. Claudia Helena Pellizzon, Luís Fernando Barbisan e Tony Fernando Grassi pelas sugestões.

Entre incertezas, experimentos que não deram certo e pequenas vitórias silenciosas, aprendi que a ciência também é feita de humanidade. Este trabalho carrega muito mais do que dados, carrega histórias, afetos e gratidão.

Neste momento tão importante, eu gostaria de agradecer especialmente aos meus pais, ao meu irmão e a minha prima Fabrícia. Durante todo esse processo, foram eles que me ergueram a cada queda, que me ajudaram em todas as dificuldades e também foram minha inspiração desde o início.

A todos aqueles familiares que se mantiveram por perto e também não hesitaram em ajudar, sempre que necessário. Destaco aqui meu primo Gabriel, minhas tias Rosana, Silmara e Sandra, e minha avó, Olga. Que de amor incondicional, foram lar e carinho aonde quer que eu fosse.

Por todos aqueles que passaram pela minha vida, durante a vida acadêmica, eu não tenho palavras para agradecer por terem feito da UNESP um ambiente tão querido e acolhedor, que além de ambiente de estudo, também se tornou casa.

Minhas amigas Cindy, Íris, Monique e Isabela, por não se cansarem de me ajudar em todos os momentos da faculdade e vida pessoal, que me acompanharam nas loucuras do dia a dia e por principalmente nunca me deixarem sozinha.

Meus amigos Renan, Lucas, Davi, Bruno e Eduardo, companheiros de todas as horas, eles estavam ali e acompanharam meu crescimento bem de perto, me ajudando nos momentos mais vulneráveis e importantes.

Minhas amigas Ana Carolina e Júlia, que me mostraram o outro lado da faculdade, e mesmo fora da faculdade, sempre estiveram de portas, braços e corações abertos para mim. De todo meu coração, obrigada.

Aos meus amigos de botucatu e meu namorado, que apareceram de maneira totalmente inesperada e hoje são cruciais na minha vida e foram também em toda essa jornada. Alex, Danone, Laura e, de maneira mais especial, Gusta, sendo este meu porto seguro, de calma e também de felicidade. Obrigada.

Às minhas melhores amigas, Bheatriz e Lyria, que abriram e fizeram-se de morada nos tempos mais difíceis, mas também comemoraram ao meu lado os momentos mais felizes. Espero continuar por perto, da mesma forma, em todos os momentos.

Por fim, por todos aqueles que não citei, mas que participaram da minha vida e estiveram comigo nessa jornada, que abriram seus corações para me ouvir e entender, eu agradeço.

CONTEXTUALIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA E SOCIAL

O atual projeto se insere no contexto biotecnológico contemporâneo ao explorar o potencial de compostos bioativos derivados de alimentos como adjuvantes a regimes consolidados de quimio- e imunoterapia no câncer colorretal, uma das principais causas de morbimortalidade no mundo. Ao empregar modelos experimentais *in vitro* mais complexos e biologicamente relevantes, o estudo contribui para o refinamento de abordagens pré-clínicas em oncologia translacional, alinhando-se aos princípios da biotecnologia aplicada à saúde humana. Do ponto de vista social, a pesquisa dialoga diretamente com a necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes, seguras e acessíveis, sobretudo em um cenário de crescente incidência e de limitações associadas à toxicidade, resistência e alto custo dos tratamentos convencionais. Ao investigar compostos amplamente associados à dieta e à cadeia produtiva de alimentos, o trabalho também reforça a interface entre ciência, inovação e impacto socioeconômico, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de intervenções adjuvantes que possam, no futuro, contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e para a sustentabilidade dos sistemas de saúde.

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) continua sendo um grande problema de saúde global e, apesar dos avanços em terapias sistêmicas, a resistência e/ou os efeitos colaterais ao 5-fluorouracil (5-FU), irinotecano (CPT-11) e bevacizumabe (BVZ) limitam sua eficácia clínica. Compostos bioativos derivados de alimentos têm ganhado atenção como potenciais adjuvantes devido aos seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos; no entanto, sua capacidade de potencializar os regimes atuais de quimio- e imunoterapia — especialmente em modelos relevantes ao microambiente tumoral (TME) — permanece pouco explorada. Este estudo investigou se compostos bioativos (fenetilisotiocianato, alilisotiocianato, capsaicina e ácido clorogênico) promovem a resposta antitumoral de *doublets* terapêuticos utilizando esferoides e co-culturas em *transwell* de HCT-116/CCD-18Co e que incorporam interações entre células tumorais e fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Valores de *half maximal effective concentration* (EC50) para cada composto e fármaco foram determinados em ambos os modelos, seguidos por tratamentos combinados e análise do índice combinatório (IC). Nos esferoides, nenhum dos compostos aumentou a citotoxicidade de 5-FU+CPT-11, e todos apresentaram antagonismo (IC>1). Em contraste, apenas o alil isotiocianato (AITC) potencializou significativamente os efeitos de BVZ+5-FU, reduzindo a viabilidade dos esferoides e exibindo leve sinergismo (IC=0,97). Com base nesse achado, o AITC foi posteriormente testado em ensaios funcionais. No sistema *transwell*, AITC + BVZ + 5-FU reduziu significativamente a motilidade das células tumorais, enquanto a formação de colônias foi reduzida de forma semelhante por todos os tratamentos, e a capacidade de invasão permaneceu inalterada. No geral, o AITC demonstrou modesto potencial adjuvante ao aumentar a resposta antitumoral de BVZ+5-FU, enquanto os demais compostos não apresentaram benefício. Esses achados ressaltam a importância de modelos relevantes ao TME em estudos pré-clínicos e sugerem o AITC como um candidato para investigações adicionais *in vivo*.

Palavras-chave: isotiocianatos; compostos bioativos; câncer colorretal; *in vitro*; esferoides.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) remains a major global health burden, and despite advances in systemic therapy, resistance/side effects to 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan (CPT-11), and bevacizumab (BVZ) limits clinical efficacy. Food-derived bioactive compounds have gained attention as potential adjuvants due to their antiproliferative and pro-apoptotic effects, yet their ability to enhance current chemo- and immunotherapy regimens - particularly in tumor microenvironment (TME)-relevant models - remains poorly explored. This study investigated whether bioactive compounds (phenethyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate, capsaicin, and chlorogenic acid) promote the antitumoral response of therapy *doublets* using CRC HCT-116/CCD-18Co spheroids and transwell co-cultures that incorporate tumor–cancer associated fibroblast (CAFs) interactions. Half maximal effective concentration (EC50) values for each compound and drug were determined in both models, followed by combination treatments (1/5 or 1/10 EC50) and analysis of combinatory index (CI). In spheroids, none of the compounds enhanced the cytotoxicity of 5-FU+CPT-11, and all showed antagonism (CI>1). In contrast, only allylisothiocyanate (AITC) significantly potentiated the effects of BVZ+5-FU, decreasing spheroid viability and displaying slight synergism (CI = 0.97). Based on this finding, AITC was further tested in functional assays. In the transwell system, AITC + BVZ + 5-FU significantly reduced cancer cell motility, while colony formation was reduced similarly by all treatments, and invasion capacity remained unchanged. Overall, AITC demonstrated modest adjuvant potential by enhancing the antitumoral response of BVZ+5-FU, while other compounds showed no benefit. These findings highlight the importance of TME-relevant models for preclinical screening and suggest AITC as a candidate for further investigation.

Keywords: isothiocyanates; bioactive compounds; colorectal cancer; *in vitro*; spheroids.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Carcinoma colorretal	6
1.1 Definições gerais, fatores de risco e epidemiologia	9
1.2 Carcinogênese de cólon	10
1.3 Estratégias terapêuticas	13
1.4 5-FU e CPT-11: aspectos gerais	16
1.5 BVZ: o <i>backbone</i> da primeira linha	20
1.6 Modelos experimentais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	24
2. Compostos bioativos: resposta adjuvante às terapias?	29
2.1 Fenetilisotiocianato (PEITC)	31
2.2 Alilisotiocianato (AITC)	33
2.3 Ácido clorogênico (ACG)	34
2.4 Capsaicina (CPS)	36
3. Referências	38
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO	51
Abstract	52
1. Introduction	53
2. Materials and Methods	54
3. Results	58
4. Discussion	66
5. Conflicts of interest	69
6. Funding	69
7. References	69
8. Appendix	75

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é responsável por aproximadamente 10% de todos os casos incidentes e das mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo (Bray et al., 2024). A chamada “ocidentalização do estilo de vida” — que inclui o uso de tabaco e bebidas alcoólicas, inatividade física, aumento da ingestão de carnes processadas e baixo consumo de fibras alimentares, frutas e vegetais — está intimamente associada ao desenvolvimento do CCR mundialmente (Chan et al., 2011; Vieira et al., 2017; Murphy et al., 2019; Amitay et al., 2020; Sawicki et al., 2021; Siegel et al., 2025). De fato, a carga do CCR é um indicador do desenvolvimento socioeconômico. Nos Estados Unidos, por exemplo, as taxas de incidência diminuíram drasticamente em ambos os sexos nas últimas décadas (1975–2020) (Siegel et al., 2025), o que pode ser atribuído ao desenvolvimento de métodos eficientes de diagnóstico e rastreamento. Enquanto isso, em países que passam por importantes transições no índice de desenvolvimento humano (IDH) (como na Ásia e na América do Sul), a incidência e a mortalidade relacionadas ao CCR estão aumentando (Siegel et al., 2025). O rastreamento precoce do CCR é bastante heterogêneo em países de baixo a médio IDH, levando a diagnósticos tardios (~25% dos casos), geralmente associados a estágios avançados da doença e metástases (Leporrier et al., 2006; De Klerk et al., 2017). Em estágios avançados, a sobrevida em cinco anos pode ser reduzida para cerca de 10% (Wang et al., 2020).

Embora a ressecção cirúrgica seja a decisão terapêutica mais comum para o CCR em geral, o 5-fluorouracil (5-FU) e o cloridrato de irinotecano (CPT-11) têm sido amplamente utilizados como base quimioterápica de primeira linha no esquema duplo FOLFIRI (5-FU + CPT-11), conforme recomendado pela Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) e pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para casos avançados de CCR (Saltz et al., 2000; Van Cutsem et al., 2014; Benson et al., 2017; Cervantes et al., 2023; Benson et al., 2024). Os metabólitos do 5-FU ligam-se à enzima timidilato sintase (TS), bloqueando a ligação do substrato normal necessário para a síntese de timidilato, essencial para a replicação e reparo do DNA das células tumorais (Santi et al., 1974; Glazer et al., 1982; Longley et al., 2003). Por sua vez, o CPT-11 é convertido em seu metabólito ativo SN-38, que estabiliza o complexo clivável topoisomerase I–DNA, resultando em lesões de dupla fita dependentes da replicação e subsequente morte das células tumorais (Armand et al., 1996; Lavelle et al., 1996).

Recentemente, a ESMO e a NCCN passaram a recomendar a combinação de esquemas baseados em 5-FU com o anticorpo bevacizumabe (BVZ), que foi o primeiro agente direcionado ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aprovado pela Food and Drug Administration para CCR metastático. De fato, o BVZ associado à quimioterapia (em diferentes esquemas) aumentou tanto a sobrevida global quanto a sobrevida livre de progressão em aproximadamente três meses, em comparação com pacientes que receberam apenas quimioterapia (Van Cutsem et al., 2014; Benson et al., 2017; Cervantes et al., 2023; Benson et al., 2024). Notavelmente, hipotetiza-se que o BVZ também atenua o crosstalk entre células tumorais e fibroblastos associados ao câncer (CAFs), que ocorre no microambiente tumoral (TME), por meio da sinalização parácrina mediada por VEGF, uma vez que as células tumorais induzem a produção de VEGFA nos CAFs (Inoue et al., 2019), e os CAFs estimulam a migração de células tumorais ao aumentar VEGFA/VEGFR1 (Wang et al., 2018).

Embora a combinação de quimioterapia com imunoterapia apresente resultados promissores para o CCR avançado, existem diversas limitações e desvantagens, como alto custo e baixa responsividade devido ao desenvolvimento de resistência aos fármacos (Xie et al., 2020). Assim, o uso de terapias adjuvantes associadas aos tratamentos convencionais é incentivado, com o objetivo de potencializar os efeitos, superar a resistência e promover a desescalada de doses. Nesse sentido, Chapelle et al. (2020) avaliaram as evidências presentes em 80 metanálises de estudos intervencionais e/ou observacionais associados à prevenção do CCR por fatores dietéticos e fármacos, sugerindo um efeito protetor do consumo de frutas e vegetais — fontes ricas em diferentes compostos bioativos — sobre o risco de desenvolvimento do CCR. Além disso, há evidências pré-clínicas crescentes, ao longo dos últimos 20 anos, sobre os benefícios de compostos bioativos derivados de alimentos na prevenção e no tratamento do CCR, incluindo dados do nosso próprio grupo (Caetano et al., 2018; Amintas et al., 2022; Bartolomeu et al., 2022). Embora alguns desses compostos — como os isotiocianatos fenetil (PEITC) e alil (AITC), a capsaicina (CPS) e os ácidos clorogênicos (CGA) — já tenham demonstrado (A) efeitos antitumorais em diferentes linhagens celulares de CCR (Cheung et al., 2008; Lai et al., 2010; Shin et al., 2015; Yun et al., 2017; Chen et al., 2018; Ekbatan et al., 2018; Liang & Kitts, 2018; Chiang et al., 2020; Ren et al., 2023), em modelos de xenotransplante de CCR derivados de linhagens celulares (Yun et al., 2017; Shin et al., 2021; Ren et al., 2023) e/ou (B) efeitos quimiopreventivos em modelos de CCR induzidos quimicamente em roedores (Caetano et al., 2018; Bartolomeu et al., 2022), ao exercerem efeitos antiproliferativos, antioxidantes, anti-inflamatórios e/ou pró-apoptóticos, seu papel adjuvante nos regimes terapêuticos sistêmicos atuais — especialmente aqueles que incluem imunoterapia — ainda é pouco investigado. Além disso, a maioria dos achados *in vitro* baseia-se em monocamadas de linhagens celulares de CCR, que não conseguem recapitular a complexidade do TME — particularmente as interações parácrinas dinâmicas com os CAFs, que são moduladores-chave da progressão tumoral, resistência terapêutica e comportamento metastático (Deng et al., 2021).

JUSTIFICATIVA

Embora alguns os compostos bioativos de interesse compostos - como os isotiocianatos fenetil (PEITC) e alil (AITC), a capsaicina (CPS) e os ácidos clorogênicos (CGA) - já tenham demonstrado (A) efeitos antitumorais em diferentes linhagens celulares de CRC, em modelos *in vivo* de CDX derivados de linhagens celulares de CRC e/ou (B) efeitos quimiopreventivos em modelos quimicamente induzidos de CRC; exercendo efeitos antiproliferativos, antioxidantes, anti-inflamatórios e/ou pró-apoptóticos, **seu papel adjuvante nos regimes atuais de terapia sistêmica** - especialmente aqueles que incluem imunoterapia - **ainda é pouco investigado**. Além disso, a maioria dos achados *in vitro* baseia-se em monocamadas de linhagens celulares de CRC, as quais não conseguem reproduzir a complexidade do microambiente tumoral - particularmente as interações dinâmicas com fibroblastos associados ao câncer, que são moduladores-chave da progressão tumoral, da resistência terapêutica e do comportamento metastático.

OBJETIVO

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar **se compostos bioativos derivados de alimentos selecionados podem potencializar os efeitos antitumorais dos regimes atuais de quimio- e imunoterapia para CRC** utilizando modelos de co-cultura 2D e 3D que incorporam interações entre células tumorais e fibroblastos associados ao câncer

5. Conflict of interest

Authors declare no conflicts of interest.

6. Funding

Guilherme R. Romualdo was the recipient of a scholarship and grant from São Paulo Research Foundation (FAPESP, 22/06082-8; 23/08751-7). Giullia C. Barbosa and Agnes S. Varicoda were recipients of FAPESP scholarships (24/09284-6 and 24/06431-8). Funders had no influence on the experiments and manuscript preparation.

7. References

- Allegrini, G., Falcone, A., Fioravanti, A., Barletta, M. T., Orlandi, P., Loupakakis, F., Cerri, E., Masi, G., Di Paolo, A., Kerbel, R. S., Danesi, R., Del Tacca, M., & Bocci, G. (2008). A pharmacokinetic and pharmacodynamic study on metronomic irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *British journal of cancer*, 98(8), 1312–1319. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604311>
- Amintas, S., Dupin, C., Boutin, J., Beaumont, P., Moreau-Gaudry, F., Bedel, A., Krisa, S., Vendrely, V., & Dabernat, S. (2022). Bioactive food components for colorectal cancer prevention and treatment: A good match. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2036095>
- Amitay, E. L., Carr, P. R., Jansen, L., Roth, W., Alwers, E., Herpel, E., Kloor, M., Bläker, H., Chang-Claude, J., Brenner, H., & Hoffmeister, M. (2020). Smoking, alcohol consumption and colorectal cancer risk by molecular pathological subtypes and pathways. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1604–1610. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0803-0>
- Armand, J. P., Ducreux, M., Mahjoubi, M., Abigeres, D., Bugat, R., Chabot, G., Herait, P., de Forni, M., & Rougier, P. (1995). CPT-11 (irinotecan) in the treatment of colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 31A(7-8), 1283–1287. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00212-2](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00212-2)
- Benson, A. B., 3rd, Venook, A. P., Cederquist, L., Chan, E., Chen, Y. J., Cooper, H. S., Deming, D., Engstrom, P. F., Enzinger, P. C., Fichera, A., Grem, J. L., Grothey, A., Hochster, H. S., Hoffe, S., Hunt, S., Kamel, A., Kirilcuk, N., Krishnamurthi, S., Messersmith, W. A., Mulcahy, M. F., ... Freedman-Cass, D. (2017). Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 15(3), 370–398. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0036>
- Benson, A. B., Venook, A. P., Adam, M., Chang, G., Chen, Y. J., Ciombor, K. K., Cohen, S. A., Cooper, H. S., Deming, D., Garrido-Laguna, I., Grem, J. L., Haste, P., Hecht, J. R., Hoffe, S., Hunt, S., Hussan, H., Johung, K. L., Joseph, N., Kirilcuk, N., Krishnamurthi, S., ... Jones, F. (2024). Colon Cancer, Version 3.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 22(2 D), e240029. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2024.0029>

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Caetano, B. F. R., Tablas, M. B., Pereira, N. E. F., de Moura, N. A., Carvalho, R. F., Rodrigues, M. A. M., & Barbisan, L. F. (2018). Capsaicin reduces genotoxicity, colonic cell proliferation and preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 338, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.11.008>

Calon, A., Lonardo, E., Berenguer-Llargo, A., Espinet, E., Hernando-Momblona, X., Iglesias, M., Sevillano, M., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D. V., Byrom, D., Cortina, C., Morral, C., Barceló, C., Tosi, S., Riera, A., Attolini, C. S., Rossell, D., Sancho, E., & Batlle, E. (2015). Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nature genetics*, 47(4), 320–329. <https://doi.org/10.1038/ng.3225>

Cervantes, A., Adam, R., Roselló, S., Arnold, D., Normanno, N., Taïeb, J., Seligmann, J., De Baere, T., Osterlund, P., Yoshino, T., Martinelli, E., & ESMO Guidelines Committee. (2023). Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 34(1), 10–32. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.003>

Chan, D. S. M., Lau, R., Aune, D., Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., & Norat, T. (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020456>

Chapelle, N., Martel, M., Toes-Zoutendijk, E., Barkun, A. N., & Bardou, M. (2020). Recent advances in clinical practice: Colorectal cancer chemoprevention in the average-risk population. *Gut*, 69(12), 2244–2255. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320990>

Chen, Y., Li, Y., Wang, X. qian, Meng, Y., Zhang, Q., Zhu, J. yun, Chen, J. qi, Cao, W. shuang, Wang, X. qi, Xie, C. feng, Li, X. ting, Geng, S. shan, Wu, J. shu, Zhong, C. yun, & Han, H. yu. (2018). Phenethyl isothiocyanate inhibits colorectal cancer stem cells by suppressing Wnt/ β -catenin pathway. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2447–2455. <https://doi.org/10.1002/ptr.6183>

Cheung, K. L., Khor, T. O., Yu, S., & Kong, A. N. T. (2008). PEITC induces G1 cell cycle arrest on HT-29 cells through the activation of p38 MAPK signaling pathway. *AAPS Journal*, 10(2), 277–281. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9032-9>

Chiang, J. H., Tsai, F. J., Hsu, Y. M., Yin, M. C., Chiu, H. Y., & Yang, J. S. (2020). Sensitivity of allyl isothiocyanate to induce apoptosis via ER stress and the mitochondrial pathway upon ROS production in colorectal adenocarcinoma cells. *Oncology reports*, 44(4), 1415–1424. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7700>

Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*, 22, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)

- Davaatseren, M., Hwang, J. T., Park, J. H., Kim, M. S., Wang, S., & Sung, M. J. (2014). Allyl isothiocyanate ameliorates angiogenesis and inflammation in dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *PloS one*, 9(7), e102975. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102975>
- De Klerk, C. M., Gupta, S., Dekker, E., & Essink-Bot, M. L. (2018). Socioeconomic and ethnic inequities within organised colorectal cancer screening programmes worldwide. *Gut*, 67(4), 679–687. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313311>
- Deng, L., Jiang, N., Zeng, J., Wang, Y., & Cui, H. (2021). The Versatile Roles of Cancer-Associated Fibroblasts in Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 733270. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.733270>
- Ekbatan, S. S., Li, X. Q., Ghorbani, M., Azadi, B., & Kubow, S. (2018). Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer caco-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19030723>
- Glazer, R. I., & Lloyd, L. S. (1982). Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture. *Molecular Pharmacology*, 21(2), 468–473.
- Henriksson, M. L., Edin, S., Dahlin, A. M., Oldenborg, P. A., Öberg, Å., Van Guelpen, B., Rutegård, J., Stenling, R., & Palmqvist, R. (2011). Colorectal cancer cells activate adjacent fibroblasts resulting in FGF1/FGFR3 signaling and increased invasion. *The American journal of pathology*, 178(3), 1387–1394. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.008>
- Hoffmann, O. I., Ilmberger, C., Magosch, S., Joka, M., Jauch, K. W., & Mayer, B. (2015). Impact of the spheroid model complexity on drug response. *Journal of biotechnology*, 205, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.029>
- Inoue, K. ichi, Kishimoto, S., Akimoto, K., Sakuma, M., Toyoda, S., Inoue, T., Yoshida, K. ichiro, Shimoda, M., & Suzuki, S. (2019). Cancer-associated fibroblasts show heterogeneous gene expression and induce vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in response to environmental stimuli. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 3(4), 416–425. <https://doi.org/10.1002/ags3.12249>
- Isella, C., Terrasi, A., Bellomo, S. E., Petti, C., Galatola, G., Muratore, A., Mellano, A., Senetta, R., Cassenti, A., Sonetto, C., Inghirami, G., Trusolino, L., Fekete, Z., De Ridder, M., Cassoni, P., Storme, G., Bertotti, A., & Medico, E. (2015). Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nature genetics*, 47(4), 312–319. <https://doi.org/10.1038/ng.3224>
- Ji, Y., & Morris, M. E. (2003). Determination of phenethyl isothiocyanate in human plasma and urine by ammonia derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 323(1), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.08.011>
- Jodrell, D. I., Stewart, M., Aird, R., Knowles, G., Bowman, A., Wall, L., & McLean, C. (2001). 5-fluorouracil steady state pharmacokinetics and outcome in patients receiving protracted venous infusion for advanced colorectal cancer. *British journal of cancer*, 84(5), 600–603. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1664>

- Lai, K. C., Chueh, F. S., Ma, Y. S., Chou, Y. C., Chen, J. C., Liao, C. L., Huang, Y. P., & Peng, S. F. (2024). Phenethyl isothiocyanate and irinotecan synergistically induce cell apoptosis in colon cancer HCT 116 cells in vitro. *Environmental toxicology*, 39(1), 457–469. <https://doi.org/10.1002/tox.23993>
- Lai, K. C., Hsu, S. C., Kuo, C. L., Ip, S. W., Yang, J. S., Hsu, Y. M., Huang, H. Y., Wu, S. H., & Chung, J. G. (2010). Phenethyl isothiocyanate inhibited tumor migration and invasion via suppressing multiple signal transduction pathways in human colon cancer HT29 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 11148–11155. <https://doi.org/10.1021/jf102384n>
- Lavelle, F., Bissery, M. C., André, S., Roquet, F., & Riou, J. F. (1996). Preclinical evaluation of CPT-11 and its active metabolite SN-38. *Seminars in oncology*, 23(1 Suppl 3), 11–20.
- Lee, S., Lim, J., & Kwak, B. (2025). Factors of bias in spheroid-based drug screening: Fabrication method, spheroid size, and cell viability. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 192, 118597. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2025.118597>
- Leporrier, J., Maurel, J., Chiche, L., Bara, S., Segol, P., & Launoy, G. (2006). A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 93(4), 465–474. <https://doi.org/10.1002/bjs.5278>
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2018). Amelioration of oxidative stress in caco-2 cells treated with pro-inflammatory proteins by chlorogenic acid isomers via activation of the Nrf2-Keap1-ARE-signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 11008–11017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03983>
- Lin, Z., Li, G., Jiang, K., Li, Z., & Liu, T. (2024). Cancer therapy resistance mediated by cancer-associated fibroblast-derived extracellular vesicles: biological mechanisms to clinical significance and implications. *Molecular cancer*, 23(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02106-8>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lu, K. W., Lu, T. J., Chueh, F. S., Lai, K. C., Hsia, T. C., Peng, S. F., Cheng, C. C., Chou, Y. C., & Hsu, F. T. (2022). Allyl Isothiocyanate (AITC) Induces Apoptotic Cell Death In Vitro and Exhibits Anti-Tumor Activity in a Human Glioblastoma GBM8401/luc2 Model. *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10411. <https://doi.org/10.3390/ijms231810411>
- Milczarek, M., Pogorzelska, A., & Wiktorska, K. (2021). Synergistic Interaction between 5-FU and an Analog of Sulforaphane-2-Oxoheptyl Isothiocyanate-In an In Vitro Colon Cancer Model. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(10), 3019. <https://doi.org/10.3390/molecules26103019>
- Murphy, N., Moreno, V., Hughes, D. J., Vodicka, L., Vodicka, P., Aglago, E. K., Gunter, M. J., & Jenab, M. (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*, 69(June), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.005>
- Park, J. I., Lee, J., Kwon, J. L., Park, H. B., Lee, S. Y., Kim, J. Y., Sung, J., Kim, J. M., Song, K. S., & Kim, K. H. (2016). Scaffold-Free Coculture Spheroids of Human Colonic Adenocarcinoma Cells

and Normal Colonic Fibroblasts Promote Tumorigenicity in Nude Mice. *Translational oncology*, 9(1), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.12.001>

Rajakumar, T., & Pugalendhi, P. (2023). Allyl isothiocyanate inhibits invasion and angiogenesis in breast cancer via EGFR-mediated JAK-1/STAT-3 signaling pathway. *Amino acids*, 55(8), 981–992. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03285-2>

Ren, X., Zhang, G., Ling, X., Zhang, L., Tian, Y., Zhu, G., Wang, P., Leavenworth, J. W., Luo, L., & Li, F. (2023). Allyl-isothiocyanate against colorectal cancer via the mutual dependent regulation of p21 and Nrf2. *European journal of pharmacology*, 957, 176016. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176016>

Rollyson, W. D., Stover, C. A., Brown, K. C., Perry, H. E., Stevenson, C. D., McNees, C. A., Ball, J. G., Valentovic, M. A., & Dasgupta, P. (2014). Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 196, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.027>

Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirotta, N., Elfring, G. L., & Miller, L. L. (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England journal of medicine*, 343(13), 905–914. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431302>

Santi, D. V., McHenry, C. S., & Sommer, H. (1974). Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*, 13(3), 471–481. <https://doi.org/10.1021/bi00700a012>

Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, 13(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>

Sepúlveda, A.M.; Uribe, D., María, A., Pedroza-díaz, J., Santa-gonz, G.A., (2025). Phytomedicine Plus Therapeutic potential of combined treatment with chlorogenic acid and 5-fluorouracil in colorectal cancer through Wnt / β -catenin pathway modulation. *Phytomedicine Plus* 5. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2025.100868>

Shin, J. M., Lim, E., Cho, Y. S., & Nho, C. W. (2021). Cancer-preventive effect of phenethyl isothiocyanate through tumor microenvironment regulation in a colorectal cancer stem cell xenograft model. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 84, 153493. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153493>

Shin, J. M., Lim, E., Cho, Y. S., & Nho, C. W. (2021). Cancer-preventive effect of phenethyl isothiocyanate through tumor microenvironment regulation in a colorectal cancer stem cell xenograft model. *Phytomedicine*, 84(July 2020), 153493. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153493>

Siegel, R. L., Kratzer, T. B., Giaquinto, A. N., Sung, H., & Jemal, A. (2025). Cancer statistics, 2025. *CA: a cancer journal for clinicians*, 75(1), 10–45. <https://doi.org/10.3322/caac.21871>

- Stalmach, A., Williamson, G., & Crozier, A. (2014). Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food & function*, 5(8), 1727–1737. <https://doi.org/10.1039/c4fo00316k>
- Sun, S., Zhang, Y., Li, Y., & Wei, L. (2023). Crosstalk between colorectal cancer cells and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment mediated by exosomal noncoding RNAs. *Frontiers in immunology*, 14, 1161628. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1161628>
- Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D., & The ESMO Guidelines Working Group. (2014). Metastatic colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(September), iii1–iii9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu260>
- Vieira, A. R., Abar, L., Chan, D. S. M., Vingeliene, S., Polemiti, E., Stevens, C., Greenwood, D., & Norat, T. (2017). Foods and beverages and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Annals of Oncology*, 28(8), 1788–1802. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx171>
- Wang, J., Li, S., Liu, Y., Zhang, C., Li, H., & Lai, B. (2020). Metastatic patterns and survival outcomes in patients with stage IV colon cancer: A population-based analysis. *Cancer Medicine*, 9(1), 361–373. <https://doi.org/10.1002/cam4.2673>
- Wang, X., Che, X., Fan, Y., Bai, M., & Qu, X. (2018). Cancer-associated fibroblasts-derived VEGFA mediates the migration of gastric cancer cells through VEGFR1. *Annals of Oncology*, 29(October), viii11. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy268.038>
- Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Yun, J. H., Kim, K. A., Yoo, G., Kim, S. Y., Shin, J. M., Kim, J. H., Jung, S. H., Kim, J., & Nho, C. W. (2017). Phenethyl isothiocyanate suppresses cancer stem cell properties in vitro and in a xenograft model. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 30, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.01.015>
- Zoetemelk, M., Rausch, M., Colin, D. J., Dormond, O., & Nowak-Sliwinska, P. (2019). Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Scientific reports*, 9(1), 7103. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42836-0>