



Revista Chilena de Cirugía

ISSN: 0379-3893

editor@cirujanosdechile.cl

Sociedad de Cirujanos de Chile
Chile

Labalde M., María; Labrador V., Francisco Javier; Golitsin D., Arturo; Pinto G., Santiago; Carlin G., Jorge; García-Parreño J., Jorge

TUMOR BUDDING Y EL CÁNCER COLORRECTAL

Revista Chilena de Cirugía, vol. 66, núm. 6, diciembre, 2014, pp. 556-561

Sociedad de Cirujanos de Chile
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=345532850008>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

 redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

TUMOR *BUDDING* Y EL CÁNCER COLORRECTAL*

Drs. María Labalde M.¹, Francisco Javier Labrador V.¹, Arturo Golitsin D.¹, Santiago Pinto G.¹, Jorge Carlin G.¹, Jorge García-Parreño J.¹

¹ Cirugía General y del Aparato Digestivo. Hospital Universitario de Guadalajara. Guadalajara, España.

Abstract

Budding tumour and colorectal cancer

Introduction: Tumour budding (TB) is defined as the presence of clusters of tumoural cells detaching from invasive margin of main tumor. It is an independent adverse prognostic factor in colorectal cancer. The aim of this study is to determinate if severity of tumor budding is associated with others prognostic factors in colorectal cancer. **Materials and Methods:** The study group is composed by 43 patients (27 males and 16 females; average age 73.4 years, (27-91) with colorectal cancer who underwent curative surgery. The histologic method of tumour budding used in this study was described by Nakamura. The applied statistical software was G-Stat 2.0. Statistical significance is accepted at $p < 0.05$. **Results:** High grade of TB was significantly associated with lymph node metastasis ($p = 0.027$), infiltrative tumour-border configuration ($p = 0.016$), lymphvessels invasion ($p = 0.02$), perineural invasion ($p = 0.009$) and tumor deposits ($p = 0.018$). There was a significant association with low grade of TB and peritumoural lymphocytic infiltration ($p = 0.004$). **Conclusions:** High grade of TB is significantly associated with other adverse prognostic factors as lymph node metastasis, infiltrative tumour-border configuration, lymphvessels invasion, venous invasion, perineural invasion and tumor deposits; and low grade of TB with favorable prognostic factor as peritumoural lymphocytic infiltration in colorectal cancer. Tumour budding can help to identify high-risk patients with colorectal cancer.

Key words: Budding tumour, colorectal cancer, prognostic factor.

Resumen

Introducción: El tumor *budding* (TB) es la presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos situadas en el frente infiltrante del tumor. Su hallazgo en alto grado es un factor de mal pronóstico independiente del cáncer colorrectal. El objetivo de este trabajo es determinar si el grado de TB está asociado con otros factores pronósticos del cáncer colorrectal. **Materiales y Métodos:** Se analizaron retrospectivamente 43 pacientes (27 varones y 16 mujeres) con una edad media de 73,4 años (27-91) intervenidos por cáncer colorrectal. El método histológico utilizado para determinar la presencia de TB fue el descrito por Nakamura en 2005. El análisis estadístico se realizó con el programa G-Stat2.0. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$. **Resultados:** La presencia de TB de alto grado se asocia

*Recibido el 3 de abril de 2014 y aceptado para publicación el 12 de mayo de 2014.

Los autores no refieren conflictos de interés.

Correspondencia: Dra. María Labalde M.
marialm007@hotmail.com

significativamente con la presencia de metástasis a ganglios linfáticos ($p = 0,027$), patrón de crecimiento infiltrativo ($p = 0,016$), invasión linfática ($p = 0,02$), perineural ($p = 0,009$) y depósitos tumorales discontinuos ($p = 0,018$). El TB de bajo grado se relaciona con la presencia de reacción linfocitaria peritumoral ($p = 0,004$). **Conclusiones:** El tumor *budding* alto grado se asocia con otros factores de mal pronóstico, como metástasis a ganglios linfáticos, crecimiento infiltrativo, invasión linfática, perineural y depósitos tumorales discontinuos; y el tumor *budding* bajo grado con factores de buen pronóstico del cáncer colorrectal como reacción linfocitaria peritumoral. El análisis del grado de tumor *budding* podría ayudar a identificar a pacientes de peor pronóstico con cáncer colorrectal.

Palabras clave: Tumor *budding*, cáncer colorrectal, factor pronóstico.

Introducción

El cáncer colorrectal es la tercera neoplasia más frecuente en el mundo y supone la cuarta causa de muerte por cáncer¹. El estudio de las características histopatológicas del tumor define el momento evolutivo del cáncer y orienta el pronóstico de la enfermedad². La estadificación tumoral del American Joint Committee on Cancer/International Union against Cancer (AJCC/UICC) del 2010 7^a edición incluye el sistema TNM (tumour-node-metastasis), la invasión venosa, linfática y perineural y la presencia de depósitos tumorales discontinuos y es el factor pronóstico actual más importante para los pacientes con CCR³. La valoración de otros factores pronósticos como el grado histológico, configuración del borde del tumor, tumor *budding*, tipo medular, niveles de antígeno carcinoembrionario, obstrucción intestinal y perforación del tumor durante la cirugía puede orientar el pronóstico del paciente así como el tratamiento de la enfermedad⁴.

El hallazgo histológico de *budding tumor* o gemación focal, definido como la presencia de células tumorales aisladas o en pequeños grupos de más de 5 células situadas en el frente infiltrante del tumor, es un factor de mal pronóstico independiente del CCR⁵⁻⁷, ya que estas células actúan a modo de *avanzadilla* preparando el terreno para que el frente invasor progrese⁸. Su hallazgo en alto grado está asociado con otras características de los tumores agresivos como el nivel T de invasión tumoral avanzado, metástasis ganglionares, grado bajo de diferenciación, patrón de crecimiento infiltrativo e invasión linfática⁹⁻¹¹.

Los objetivos de este trabajo son determinar si la presencia de TB está asociada con otros factores anatopatológicos de mal pronóstico del CCR como la afectación ganglionar, tamaño tumoral superior a 5 cm, configuración del margen tumoral infiltrativa, invasión linfática, vascular y perineural y existencia de depósitos tumorales discontinuos; y estudiar su relación con factores de buen pronóstico del CCR como la presencia de reacción linfocitaria intratumoral y peritumoral e inestabilidad de los microsatélites.

Material y Método

Se analizó retrospectivamente un total de 43 pacientes con CCR sometidos a cirugía en el Hospital Universitario de Guadalajara durante el período comprendido desde abril a noviembre de 2013, de los que 27 (63%) fueron varones y 16 (37%) mujeres, con una edad media de 73,7 años (27-91). Se excluyeron los casos en los que no se realizó resección del tumor. El diagnóstico histológico de la biopsia del tumor obtenida mediante colonoscopia fue de adenocarcinoma en todos los casos. La localización del tumor fue en el colon derecho en 16 (37%) casos, izquierdo en 16 (17%) y recto en 11 (26%). La distribución del riesgo anestésico según la escala ASA fue: 2 (5%) pacientes con ASA I, 24 (55%) con ASA II, 15 (35%) con ASA III y 2 (5%) con ASA IV. Se realizaron 13 (30%) hemicolectomías derechas, 13 (30%) sigmoidectomías, 8 (18%) resecciones anteriores bajas, 3 (7%) resecciones segmentarias de colon, 3 (7%) hemicolectomías izquierdas, 2 (5%) intervenciones de Hartmann y una (3%) amputación abdominoperineal. Respecto a los estadios tumorales según la clasificación TNM del AJCC 7^a ed. 2010 se incluyeron 20 (46%) casos con estadio II, 16 (37%) con estadio III, 5 (12%) con estadio IV y 2 con estadio I (5%).

El estudio histológico de los especímenes resecados sigue las recomendaciones de la *European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Screening and Diagnosis 1^a ed.*¹². Se recogieron datos de los informes de anatomía patológica de las muestras examinadas por un patólogo sobre tumor *budding*, tipo y grado histológico, estadificación según TNM (7^a edición), número de ganglios linfáticos aislados, patrón de crecimiento, invasión linfática, vascular y perineural, depósitos tumorales discontinuos, tamaño tumoral, diferenciación mucinosa, reacción linfocitaria intratumoral y peritumoral e inestabilidad de los microsatélites.

El método anatopatológico utilizado en este estudio que determina la presencia de TB y su grado es el descrito y validado por Nakamura en 2005^{13,14}. Emplea la tinción Hematoxilina-eosina sobre cortes de tumor que incluyen las secciones

más extensas del borde invasor. Su examen bajo el microscopio óptico permite identificar grupos de células indiferenciadas malignas en el frente invasor que constituyen la desdiferenciación focal o TB. Se definen cuatro niveles: ausente (no hay células indiferenciadas más allá del margen invasor), leve (desdiferenciación focal presente en menos de 1/3 de la longitud del margen invasor), moderado (entre 1/3 y 2/3), marcado (en más de 2/3). Estos niveles pueden agruparse en dos grados: bajo (ausente y leve) y alto (moderado y marcado).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa informático G-Stat 2.0. En el análisis descriptivo los resultados se expresaron como frecuencias (porcentajes) para variables cualitativas y como media (rango) para variables cuantitativas. Para comparar las variables cualitativas se aplicó la prueba de contraste de hipótesis χ^2 y de Fisher, en aquellos casos en los que no se cumplen los criterios para utilizar χ^2 . Se consideraron las diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

Análisis descriptivo de los grados de tumor budding

La distribución de los grados de TB según la clasificación de Nakamura¹³ fue la siguiente: 32 (74%) casos de bajo grado, entre los que 27 (63%) se definieron como leve y 5 (11%) como ausente, y 11 (26%) casos de alto grado, entre los que se clasificaron 2 (4%) casos como moderado y 9 (22%) como marcado.

Análisis descriptivo de las características histopatológicas del tumor

Todos los casos incluidos en este estudio fueron adenocarcinomas. La distribución de los casos según la estadificación TNM de la AJCC (7th ed., 2010) y otras características histológicas se describen en la Tabla 1.

Relación entre grados de tumor budding y factores de mal pronóstico del CCR

Se analizó si existe relación entre el grado de TB y otros factores de mal pronóstico del CCR (Tabla 2).

Se demostró que existe asociación estadísticamente significativa entre el grado alto de TB y otros factores del mal pronóstico del CCR incluidos en la estadificación TNM del AJCC (7th ed., 2010) como la presencia de metástasis a ganglios linfáticos ($p = 0,027$), invasión linfática ($p = 0,02$), perineural ($p = 0,009$) y depósitos tumorales discontinuos ($p = 0,018$). Con respecto a otros factores del mal

Tabla 1. Análisis descriptivo de las características histopatológicas del tumor (n = 43)

	Frecuencia, n (%)	
Adenocarcinoma	43	(100)
Grado histológico		
Bajo	38	(88)
Alto	5	(12)
Estadificación TNM (7 ^a ed., 2010)		
- Nivel T invasión de la pared		
- T1	1	(2)
- T2	4	(9)
- T3	24	(56)
- T4	14	(33)
- Afectación ganglionar		
- N0	24	(56)
- N1	12	(28)
- N2	7	(16)
- Metástasis a distancia		
- M0	36	(84)
- M1	7	(16)
n de ganglios linfáticos aislados	18,3	(10-39)
Invasión linfática	15	(35)
Invasión vascular	10	(23)
Invasión perineural	17	(40)
Depósitos tumorales discontinuos	11	(26)
Patrón de crecimiento		
Infiltrativo	26	(61)
Expansivo	17	(40)
Diferenciación mucinosa	10	(23)
Tamaño tumoral > 5 cm	25	(58)
Reacción linfocítica intratumoral	20	(46)
Reacción linfocítica peritumoral	34	(79)
IMS	7	(16)

pronóstico del CCR no incluidos en la estadificación TNM del AJCC (7th ed., 2010) se ha encontrado asociación estadística entre el grado alto de TB y el crecimiento tumoral infiltrativo ($p = 0,016$). Sin embargo, no se ha encontrado significación estadística en la relación entre el grado alto de TB y la invasión venosa, el tamaño tumoral mayor o igual a 5 cm, la diferenciación mucinosa y el grado histológico.

Relación entre grados de tumor budding y factores de buen pronóstico del CCR

Se analizó si existe relación entre el grado de TB y factores de buen pronóstico del CCR (Tabla 3).

Se demostró que existe asociación estadísticamente significativa entre el grado bajo de TB y la presencia de reacción linfocítica peritumoral

Tabla 2. Relación entre grados de tumor *budding* y factores de mal pronóstico del CCR

		TB alto Grado (%) n = 11	TB bajo Grado (%) n = 32	Valor p
Grado histológico	Bajo	9 (21)	29 (67)	0,589
	Alto	2 (4)	3 (7)	
Ganglios linfáticos regionales	N+	8 (18)	11 (26)	0,027*
	N0	3 (7)	21 (49)	
Invasión linfática	Sí	7 (16)	8 (19)	0,02*
	No	4 (9)	25 (56)	
Invasión vascular	Sí	5 (11)	5 (11)	0,091
	No	6 (15)	27 (63)	
Invasión perineural	Sí	8 (19)	9 (21)	0,009*
	No	3 (7)	23 (53)	
Depósitos tumorales discontinuos	Sí	6 (15)	5 (11)	0,018*
	No	5 (11)	27 (63)	
Patrón crecimiento	Infiltrativo	10 (24)	16 (37)	0,016*
	Expansivo	1 (2)	16 (37)	
Tamaño > 5 cm	Sí	7 (17)	18 (42)	0,668
	No	4 (9)	14 (32)	
Diferenciación mucinosa	Sí	7 (17)	22 (51)	0,754
	No	4 (9)	10 (23)	

TB: tumor *budding*. *Diferencias estadísticamente significativas.**Tabla 3. Relación entre grados de tumor *budding* y factores de buen pronóstico del CCR**

		TV alto Grado (%) n = 11	TB bajo Grado (%) n = 32	Valor p
Reacción linfocítica peritumoral	Sí	5 (12)	29 (67)	0,004*
	No	6 (14)	3 (7)	
Reacción linfocítica intratumoral	Sí	7 (16)	13 (30)	0,186
	No	4 (9)	19 (44)	
Inestabilidad de los microsatélites	Sí	8 (19)	27 (64)	1,0
	No	2 (5)	5 (12)	

TB tumor *budding*, RL, IMS. *Diferencias estadísticamente significativas.

(p = 0,004). Sin embargo, no se ha encontrado significación estadística en la relación entre el grado bajo y la presencia de reacción intratumoral ni de inestabilidad de los microsatélites.

Discusión

El TB de alto grado es un factor de mal pronóstico independiente del cáncer colorrectal^{7,8} y también de otros tumores como el ampuloma¹⁵ y el cáncer

de pulmón¹⁶. Nuestros resultados demuestran que existe relación estadísticamente significativa entre el tumor *budding* de alto grado y otros factores de mal pronóstico del cáncer colorrectal como la presencia de metástasis en ganglios linfáticos invadidos por tumor, invasión linfática y perineural, depósitos tumorales discontinuos y patrón de crecimiento infiltrativo. Estos resultados se asemejan a los de otros estudios ya que también relacionan el TB de alto grado con otros factores de mal pronóstico del cáncer colorrectal como el nivel T de invasión de la

pared tumoral avanzado, grado bajo de diferenciación tumoral y metástasis a distancia^{17,18}. Además, el presente artículo coincide con otras investigaciones en relacionar el TB de alto grado con metástasis ganglionares y con la presencia de invasión linfática¹⁹⁻²¹.

La estadificación tumoral del AJCC/UICC 7^a ed. de 2010 en la que se incluye el sistema TNM (*tumour-node-metastasis*) y otros parámetros como la invasión linfática, venosa, perineural y la presencia de depósitos tumorales discontinuos, es el factor pronóstico más importante del cáncer colorrectal^{3,22,23}. Según esta clasificación la mayoría de los casos de CCR en estadio II no son seleccionados para quimioterapia adyuvante y la cirugía con resección R0 se considera el tratamiento curativo. Sin embargo, un porcentaje en torno al 25% de los estadios I-II con N negativos se comportan como estadios más avanzados y desarrollan metástasis a distancia^{24,25}. En pacientes con CCR en estadio II (N negativos) las tasas de supervivencia a 5 años varían desde un 63%, en casos con TB alto grado, hasta un 91%, en casos de TB bajo grado²⁶. El grado TB como factor de mal pronóstico independiente en el CCR puede ser útil para identificar ese subgrupo de pacientes en estadio II con peor pronóstico que se comportan como estadios más avanzados y que se beneficiarían de tratamientos adyuvantes tras la cirugía para aumentar las tasas de supervivencia²⁷.

La presencia de TB intratumoral en las biopsias obtenidas mediante colonoscopia también se asocia a metástasis en ganglios linfáticos, estadio avanzado, invasión vascular y mal pronóstico²⁸. De este modo, el estudio del grado de TB intratumoral en las biopsias de los estudios preoperatorios puede tener una gran relevancia clínica ya que podría contribuir a definir su pronóstico y planear la mejor estrategia terapéutica antes de la cirugía²⁹.

Por otro lado, el TB de bajo grado se ha asociado a otro factor de buen pronóstico del CCR como la infiltración linfocítica peritumoral de forma estadísticamente significativa en este trabajo. Otras publicaciones también demuestran esta asociación³⁰. Este hecho explica como una reacción peritumoral linfocítica marcada en el margen tumoral es un factor de buen pronóstico del CCR porque la reacción inflamatoria peritumoral puede promover la destrucción de las células de TB mediante un proceso de apoptosis^{31,32}. La aplicación clínica deducida de estas investigaciones consiste en la posibilidad de desarrollar terapias inmunes que aumenten la reacción inflamatoria dirigida contra las células de tumor budding y mejorar el pronóstico de los pacientes³³.

La falta de consenso en el método anatomopatológico que evalúa el grado de TB y su clasificación, así como la utilización de técnicas diferentes para

identificar las células *buds* como la tinción con hematoxilina-eosina o técnicas inmunohistoquímica con citoqueratina dificultan la comparación de resultados en los diferentes trabajos. Sin embargo, a pesar de que el método para evaluar el grado de tumor *budding* no está estandarizado, todos los autores coinciden en que las categorías con mayor grado de TB se asocian a un peor pronóstico en el CCR¹⁴. En este estudio, se utiliza la tinción con hematoxilina-eosina y la clasificación descrita por Nakamura¹³. Es un método cualitativo con variaciones interobservador, aunque está validado y se incluye en la *European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Screening and Diagnosis 1^a ed.*¹².

Conclusión

El Tumor *budding* de alto grado está asociado con otros factores de mal pronóstico del CCR como ganglios linfáticos regionales metastásicos, invasión linfática y perineural, patrón de crecimiento infiltrativo y depósitos tumorales discontinuos. El tumor *budding* de bajo grado se relaciona con otros factores de buen pronóstico del CCR con la reacción linfocítica peritumoral. El análisis del grado de TB podría ayudar a identificar pacientes con CCR de peor pronóstico.

Referencias

1. Jernel A, Bray F, Center MM. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61:69-90.
2. Dukes CE. The relation of histology to spread in intestinal cancer. BR J Cancer 1950;4:59-62.
3. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Green FL, Trott A. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, Springer. 2010;143-64.
4. Compton C. Pronostic Factors in Cancer. 3rd ed. Wiley-Liss. New York. 2006.
5. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. Histopathology 2007;50:151-62.
6. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. Br J Cancer 2012;106:1713-7.
7. Grizzi F, Celesti G, Basso G, Laghi L. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hyde or hope? WJG 2012;18:6532-6.
8. Jiang B, Mason J, Jewett A, Qian J, Ding J, Cho W, et al. Cell budding from normal appearing epithelia: a predictor of colorectal cancer metastasis? Int J Biol Sci. 2013;9:119-33.
9. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Pronostic value of tumor budding in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1993;36:627-35.

10. Kye BH, Jung JH, Kim HJ, Kang SG, Cho HM, Kim G. Tumor budding as a risk factor of lymph node metastasis in submucosal invasive T1 colorectal carcinoma: a retrospective study. *BMC Surgery* 2012;12:16.
11. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H. Tumour budding as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002;40:127-32.
12. Quirke P, Risio M, Lambert RM, Karsa L, Vieth M. European Guidelines for Quality Assurance in Colorectal Screening and Diagnosis. *Endoscopy*. 2012;44:116-30.
13. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtami Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;32:1432-5.
14. Puppa G, Senore C, Sheahan K, Vieth M, Luigli A, Zlobec I, et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology* 2012;61:562-75.
15. Ohike N, Coban I, Kim GE. Tumor budding as a strong prognostic indicator in invasive ampullary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1417-24.
16. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M. Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. *J Thorac Oncol*. 2010;5:1361-8.
17. Choi HJ, Park KJ, Shin JS, Rob MS, Kwon HC, Lee HS. Tumor budding as a prognostic marker in stage III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2007;22:863-8.
18. Nakamura T, Mitomi H, Kanazawa H, Ohkura Y, Watanabe M. Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2008;51:568-72.
19. Morodoni T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989;63:539-43.
20. Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T. Tumor budding is predictive of lymphatic involvement and lymph node metastases in submucosal invasive colorectal adenocarcinomas and in nonpolypoid compared with polypoid growths. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44:605-14.
21. Okuyama T, Oya M, Yamaguchi M. Budding (sprouting) as a useful prognostic marker in colorectal mucinous carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2002;32:412-6.
22. Gao P, Song Y, Wang Z, Xu Y, Tong L, Sun J, et al. Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. *BMC Cancer* 2013;13:123-34.
23. Mroczkowski P, Schmidt U, Sahm M, Gastinger I, Lippert H, Kube R. Prognosis factors assessed for 15,096 patients with colon cancer in stages I and II. *World J Surg*. 2012;36:1693-8.
24. Schippinger W, Samonigg H, Scarberl-Moser R. A Prospective randomised phase III trial of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with stage II colon cancer. *Br J Cancer* 2007;97:1021-7.
25. Glimelius B, Cavalli-Björkman N. Metastatic colorectal cancer: current treatment and future options for improved survival. *Medical approach present status*. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47:296-314.
26. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:134-41.
27. Mitrovic B, Schaeffer DF, Ridell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol*. 2012;25:1315-25.
28. Giger O, Comtesse S, Lugli S, Zlobec I, Kurrer M. Intratumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum Mod Pathol*. 2012;25:160-6.
29. Rogers AC, Gibbons D, Hanly A, Hyland J, O'Connell PR, Winter DC, et al. Prognosis significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy. *Mod Pathol*. 2014;27:156-62. doi: 10.1038/modpathol.2013.124. Epub 2013 Jul 26.
30. Shinto E, Mochizuki H, Ueno H, Matsubara O, Jass JR. A novel classification of tumor budding in colorectal cancer based on the presence of cytoplasmic pseudo-fragments around budding foci. *Histopathology* 2005;47:25-31.
31. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognosis classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1:1303-6.
32. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Vare PO, Melkko J, Tuomire H. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41:2645-54.
33. Zlobec I, Lugli A, Baker K, Roth S, Mino P, Hatachi S, et al. Role of APAF-I, E-cadherine and peritumoural lymphocytic infiltration in tumour budding in colorectal cancer. *J Pathol*. 2007;212:260-8.