

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA



Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

Anno accademico 2019/2020

“Riproducibilità inter ed intra-osservatore nella valutazione del budding tumorale nell’adenocarcinoma del colon-retto: confronto fra ematossilina-eosina ed immunoistochimica”

Relatore: Chiar.mo Prof. Luca Mastracci

Candidato: Luca Carlin

SOMMARIO

1. Introduzione: carcinoma del colon-retto	3
1.1 Epidemiologia.....	6
1.2 Eziologia.....	6
1.3 Patogenesi	9
1.4 Vie patogenetiche molecolari	9
1.4.1 Instabilità cromosomica	9
1.4.2 Instabilità dei microsatelliti.....	14
1.4.3 Fenotipo metilatore delle isole CpG	16
1.5 Vie clinico-patologiche.....	17
1.6 Istopatologia	19
1.7 Clinica e diagnosi	20
1.8 Stadiazione.....	21
1.9 Fattori prognostici.....	23
2. Budding	26
2.1 Budding.....	27
2.2 Metodi di valutazione del budding	29
3. Obiettivi dello studio	33
4. Materiali e metodi	35
4.1 Selezione dei campioni	36
4.2 Raccolta dei dati clinici	36
4.3 Colorazione immunohistochimica	36
4.4 Esame istologico.....	36
4.5 Analisi statistiche.....	37
5. Risultati	39
5.1 Caratteristiche dei pazienti	41
5.2 Riproducibilità del budding con le due colorazioni.....	41
5.3 Confronto fra grading tradizionale e i nuovi sistemi.....	43
6. Discussione e conclusioni	48
Bibliografia.....	53

1 – INTRODUZIONE: CARCINOMA DEL COLON-RETTO

Il carcinoma coloretale (CCR) è la più comune neoplasia maligna del tratto gastrointestinale e un'importante causa di morbilità e mortalità in tutto il mondo.

È, infatti, il terzo tumore più diagnosticato negli uomini e il secondo nelle donne, e, nonostante l'introduzione di efficaci tecniche di screening e il miglioramento dei protocolli terapeutici, continua a rappresentare nella popolazione generale la seconda causa di morte oncologica.¹

La sopravvivenza a 5 anni si attesta complessivamente sul 64%, seppur variando dal 92% al 12% a seconda dello stadio di malattia.²

Stima globale dell'incidenza nel 2018, maschi (esclusi i tumori cutanei non-melanoma)

** Incidenza grezza e standardizzata per età su 100.000*

Neoplasia	Numero	Incidenza grezza	Incidenza standardizzata per età
Polmone	1368524	355	315
Prostata	1276106	331	293
Colon-retto	1026215	266	236
Stomaco	683754	178	157
Fegato	596574	155	139

Stima globale dell'incidenza nel 2018, femmine (esclusi i tumori cutanei non-melanoma)

** Incidenza grezza e standardizzata per età su 100.000*

Neoplasia	Numero	Incidenza grezza	Incidenza standardizzata per età
Mammella	2088849	552	463
Colon-retto	823303	218	163
Polmone	725352	192	146
Cervice	569847	151	131
Tiroide	436344	115	102

Stima globale dell'incidenza nel 2018 (esclusi i tumori cutanei non-melanoma)

** Incidenza grezza e standardizzata per età su 100.000*

Neoplasia	Numero	Incidenza grezza	Incidenza standardizzata per età
Polmone	2093876	274	225
Mammella	2088849	552	463
Colon-retto	1849518	242	197
Prostata	1276106	331	293
Stomaco	1033701	135	111

Stima globale della mortalità nel 2018, maschi (esclusi i tumori cutanei non-melanoma)** Incidenza grezza e standardizzata per età su 100.000*

Neoplasia	Numero	Incidenza grezza	Incidenza standardizzata per età
Polmone	1184947	308	271
Fegato	548375	142	127
Stomaco	513555	133	117
Colon-retto	484224	126	108
Prostata	358989	93	76

Stima globale della mortalità nel 2018, femmine (esclusi i tumori cutanei non-melanoma)** Incidenza grezza e standardizzata per età su 100.000*

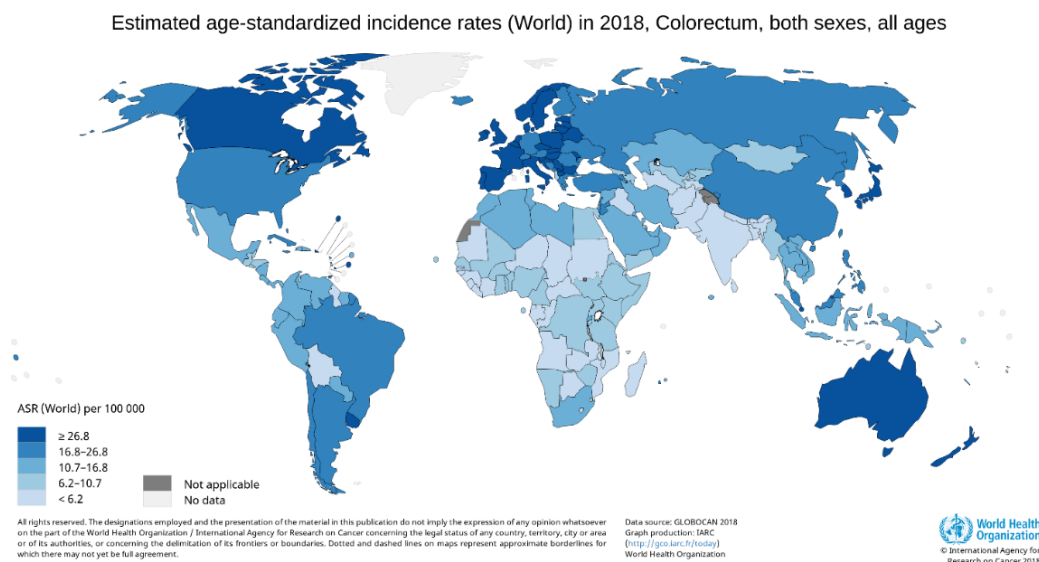
Neoplasia	Numero	Incidenza grezza	Incidenza standardizzata per età
Mammella	626679	166	130
Polmone	576060	152	112
Colon-retto	396568	105	72
Cervice	311365	82	69
Stomaco	269130	71	52

Stima globale della mortalità nel 2018 (esclusi i tumori cutanei non-melanoma)** Incidenza grezza e standardizzata per età su 100.000*

Neoplasia	Numero	Incidenza grezza	Incidenza standardizzata per età
Polmone	1761007	231	186
Colon-retto	880792	115	89
Stomaco	782685	103	82
Fegato	781631	102	85
Mammella	626679	166	130

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Nel 2018 sono stati stimati globalmente 1849518 nuovi casi e 880792 morti, con le maggiori incidenze riportate in Ungheria, Corea del Sud e Slovacchia (con un tasso standardizzato per età di rispettivamente 51.2/100000 casi, 44.5/100000 casi e 43.8/100000 casi).³



Il picco di incidenza si colloca tra i 60 e i 70 anni di età, mentre meno del 20% dei casi si verifica prima dei 50 anni.

Il carcinoma coloretale è considerato un marcatore epidemiologico di transizione nutrizionale: paesi un tempo a bassa incidenza, come il Giappone, hanno registrato un importante aumento delle diagnosi in seguito all'adozione di stili di vita e regimi alimentari più vicini a quelli occidentali.^{4,5}

1.2 EZIOLOGIA

Come è facilmente intuibile, i principali fattori di rischio per lo sviluppo di un carcinoma del colon-retto sono fattori dietetici, ma anche fattori non dietetici possono avere un ruolo importante nella cancerogenesi. Ad oggi, i fattori riconosciuti sono:

- Una dieta iperlipidica che induce un'elevata secrezione di acidi biliari, convertiti poi dalla flora batterica intestinale in acidi biliari secondari (soprattutto acido litocolico e desossicolico) che promuovono la

cancerogenesi attraverso l'induzione di una reazione infiammatoria mucosale, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, la degradazione della p53, la sovraespressione di XIAP, l'interazione con il recettore muscarinico 3 e con la via di signaling Wnt/ β -catenina.⁶ Anche l'aumentata concentrazione di acidi grassi liberi nel lume intestinale esercita un effetto lesivo sulla mucosa, aggravando la risposta infiammatoria.⁷

- Il consumo di carni rosse lavorate che espone il tratto gastro-intestinale a diverse sostanze cancerogene come ammine eterocicliche, idrocarburi policiclici aromatici e N-nitrosammine.⁷
- Una dieta ipercalorica che, attraverso l'aumento dei livelli circolanti di macronutrienti e fattori di crescita come glucosio, acidi grassi liberi, insulina e IGF1, favorisce la crescita tumorale attraverso un aumento della proliferazione, l'inibizione dell'apoptosi, l'attivazione dei PPAR, l'induzione di stress ossidativo e di uno stato infiammatorio cronico.⁷
- Il consumo di alcool che esercita attività carcinogenica indirettamente, attraverso un suo metabolita, l'acetaldeide, che può formare legami covalenti con il DNA e indurre mutazioni a livello di oncogeni e oncosoppressori, anomalie della metilazione e disfunzione della riparazione genomica.⁸
- L'obesità, soprattutto se associata a sindrome metabolica, attraverso riduzione di adiponectina, aumento della leptina, induzione di uno stato infiammatorio cronico subclinico, modificazione della composizione della bile e alterazioni del microbiota intestinale.⁹
- Il fumo di sigaretta si associa ad una maggiore incidenza di CCR e ad un maggior tasso di mortalità ad esso correlato; inoltre i fumatori sono più spesso affetti da CCR MSI-H, CIMP e con mutazione di BRAF.^{10,11}
- Una statura alta, attraverso meccanismi non ancora ben definiti, determina un lieve aumento del rischio di sviluppare alcune neoplasie, fra cui il CCR. L'associazione può essere spiegata dal maggior numero di cellule, dalle maggiori dimensioni viscerali e dai maggiori livelli circolanti di IGF1 durante l'infanzia e l'adolescenza.¹²

- Alcune sindromi genetiche tra cui le più comuni FAP, HNPCC, sindrome di Peutz-Jeghers e poliposi giovanile.
- Altre entità clinico-patologiche come le malattie infiammatorie croniche intestinali (il morbo di Crohn e soprattutto la rettocolite ulcerosa) e l'acromegalia.

Fattori protettivi sono invece:

- Una regolare attività fisica. Si ritiene che il principale meccanismo sia rappresentato da un effetto insulino-sensibilizzante, ma sono stati proposti anche un aumento della velocità di transito intestinale, un potenziamento del sistema immunitario e un'alterazione della composizione della bile.¹³
- Il consumo di fibre alimentari, che determina una diluizione dei carcinogeni contenuti nelle feci, una riduzione del tempo di transito fecale e la cui fermentazione, da parte del microbiota, porta alla formazione di acidi grassi a catena corta.¹⁴
- Il consumo di latticini per i quali sono stati proposti diversi meccanismi, tra cui i principali sono: legame fra calcio e acidi grassi ionizzati e acidi biliari secondari con inibizione del loro effetto proliferativo sulla mucosa, interazione fra calcio e diverse vie di signaling intracellulari che porta a differenziazione nelle cellule normali e apoptosi nelle cellule tumorali.¹⁵
- L'assunzione cronica di acido acetilsalicilico a basse dosi è stata dimostrata efficace nel prevenire l'insorgenza di CCR. Si sospetta che tale effetto sia mediato dall'inibizione della COX2, che risulta iper-espressa nel 43% degli adenomi e nell'86% dei carcinomi.¹⁶ La COX2 è infatti responsabile della produzione di PGE2, che esplica effetti proliferativi, anti-apoptotici, angiogenetici, sulla migrazione e sull'invasione.^{17,18} Nonostante questo effetto protettivo sia noto da diversi anni e recentemente l'AIFA abbia autorizzato l'aggiornamento del 'Riassunto delle caratteristiche del prodotto' circa gli effetti oncologici dell'aspirina, non esiste ancora alcuna indicazione al suo utilizzo per ridurre l'incidenza di CCR.

1.3 PATOGENESI

Il CCR presenta, fra le neoplasie maligne più frequenti, una delle percentuali maggiori di casi familiari.¹⁹

La maggior parte (60/70%) dei carcinomi coloretali sono sporadici, ossia non si individuano elementi che suggeriscano la possibilità di un fattore genetico predisponente. Si tratta di pazienti con età superiore ai 50 anni, senza storia familiare di CCR precoce. Una percentuale minore, ma comunque consistente (25/30%) di CCR sono familiari, ovvero nascono in un contesto familiare di CCR precoce o di più parenti di primo grado affetti. In queste famiglie verosimilmente si ha trasmissione di geni predisponenti, ma anche presenza di fattori ambientali condivisi. Una piccola frazione dei casi (2/5%) è definita ereditaria in quanto associata a specifiche anomalie genetiche, responsabili di sindromi quali HNPCC, FAP, AFAP, APCI 1307K, sindrome di Peutz-Jeghers, MAP (poliposi associata a MYH), poliposi giovanile e poliposi ereditaria.

Nella carcinogenesi del colon-retto si distinguono due fasi: una di “iniziazione”, rappresentata dalla trasformazione dell’epitelio normale in adenoma, e una di “promozione” che segna il passaggio dall’adenoma al carcinoma.

1.4 VIE PATOGENETICHE MOLECOLARI

La combinazione di eventi molecolari che portano all’adenocarcinoma del colon è molto varia e comprende anomalie genetiche ed epigenetiche. Come spesso accade nella medicina, molte informazioni sulla patogenesi del CCR sono state acquisite attraverso lo studio dei geni coinvolti nelle forme ereditarie della malattia, essendo gli stessi responsabili anche delle forme sporadiche. Attualmente sono conosciute tre principali vie molecolari che possono portare allo sviluppo di CCR.

1.4.1 INSTABILITÀ CROMOSOMICA

L’instabilità cromosomica (CIN), responsabile di circa l’80% dei carcinomi sporadici e dell’insorgenza di CCR nella FAP, è alla base della classica sequenza adenoma-carcinoma, descritta per la prima volta da Fearon e Vogelstein nel 1990 attraverso un modello patogenetico tetra-fasico.²⁰

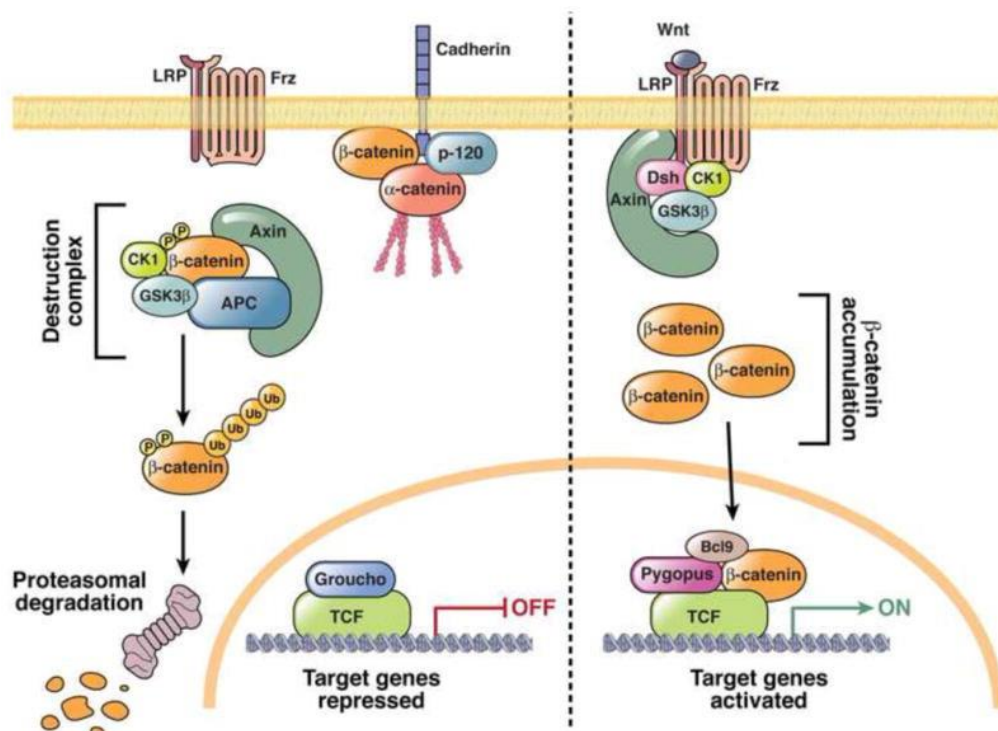
Il primo step è costituito dall'attivazione della via di signaling Wingless/Wnt, coinvolta nei processi di differenziamento, proliferazione e migrazione cellulare. Questa via è altamente conservata in tutti i metazoi e deve il nome alla fusione fra l'oncogene Wingless della *Drosophila Melanogaster* e il suo corrispettivo gene murino Integrated (Int-1).²¹ Generalmente l'attivazione della via Wnt è secondaria alla mutazione del gene APC, presente in circa il 70% dei CCR; entrambe le copie del gene devono essere disattivate funzionalmente, mediante mutazione (germinale o somatica) o eventi epigenetici, affinché la carcinogenesi abbia inizio. Mentre le mutazioni germinali possono distribuirsi lungo tutta la sequenza del gene, quelle somatiche tendono a localizzarsi all'estremità 5' dell'esone 15, tra i residui amminoacidici 1280-1500.²² Indipendentemente dal meccanismo di acquisizione, più del 90% delle mutazioni di APC conducono all'inserzione di un codone di stop prematuro, che porta alla traduzione di una proteina tronca.^{22,23}

La proteina codificata dal gene APC presenta molteplici domini funzionali capaci di interagire con diverse proteine intra-cellulari come β -catenina, γ -catenina, glicogeno-sintasi-chinasi (GSK), axina, tubulina, EB1 e hDLG.²⁴ Fisiologicamente GSK-3 β , attraverso il legame con APC, fosforila la β -catenina determinandone la degradazione attraverso un processo di ubiquitinazione.²⁵ Il troncamento della proteina impedisce la formazione del complesso APC-GSK-3 β e, conseguentemente, la degradazione della β -catenina.

La proteina si accumula, quindi, nel citoplasma e migra a livello nucleare dove interagisce con i fattori di trascrizione della famiglia TCF/LEF (T-cell Factor/Lymphoid Enhancing Factor) il più rappresentato dei quali, nell'epitelio colico, è il TCF-4. Quest'interazione conduce all'iper-espressione di oncogeni quali c-Myc, ciclina D1, c-Jun, Fra-1 e il recettore dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico.²⁶⁻²⁹

Il ruolo di APC nella carcinogenesi del CCR è essenziale nella fase di iniziazione mentre sono necessarie altre alterazioni per progredire alla promozione, come dimostrato dall'analogia prevalenza della sua mutazione nei polipi adenomatosi e nei carcinomi invasivi.^{23,30}

La mutazione di APC, tuttavia, non è l'unico meccanismo a poter attivare la via Wnt: sono infatti state identificate mutazioni gain-of-function del gene della β -catenina (CTNNB1) in circa il 50% delle neoplasie (sia adenomi che carcinomi) con APC wild-type e, complessivamente, nel 4-15% di quelle sporadiche, localizzate prevalentemente nei residui amminoacidici 29-45 dell'esone 3.³¹⁻³³ La prevalenza della mutazione di CTNNB1 diminuisce drasticamente dagli adenomi benigni (12,5%) ai carcinomi invasivi (1,4%), suggerendo che questa sia caratterizzata da una minor probabilità di progressione carcinogenetica.³²

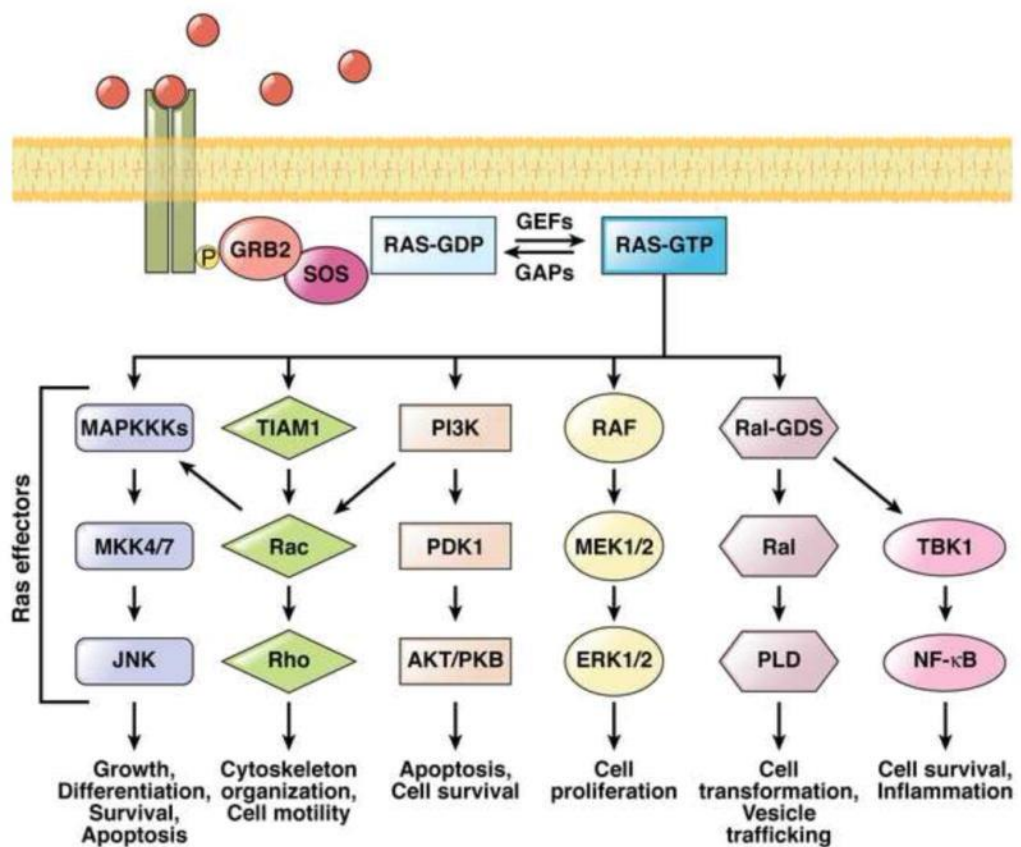


Il secondo step è costituito dall'attivazione della via di signaling MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), anch'essa coinvolta nei processi di differenziazione e proliferazione cellulare. L'oncogene più comunemente mutato fra i componenti di questa via è rappresentato da KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue), codificante per una GTP-asi appartenente alla famiglia delle proteine Ras; la sua mutazione, generalmente di tipo missenso, è infatti presente in circa il 50% delle neoplasie colo-rettali, localizzata nella maggior parte dei casi sui codoni 12, 13 e 61.^{34,35}

Fisiologicamente la proteina K-Ras si trova in forma attiva quando lega una molecola di GTP ed in forma inattiva quando lega una molecola di GDP,

idrolizzata dalla sua intrinseca attività enzimatica. La mutazione ne impedisce l'attività GTP-asi, rendendo la proteina costitutivamente attiva; questa va dunque ad attivare B-Raf, una chinasi che, attraverso un sistema di fosforilazione a cascata che coinvolge le chinasi MAPKK (MEK) e MAPK (ERK), determina l'attivazione di fattori di trascrizione quali Elk-1, Sap-1a, c-Ets-1, c-Myc e c-Fos.^{36,37}

Il terzo step è rappresentato da ampie delezioni di segmenti cromosomici che conducono alla perdita di uno dei due alleli nei geni coinvolti. Questo fenomeno è definito “perdita di eterozigosi” ed ha un ruolo primario nella fase di promozione carcinogenetica, in quanto rende sufficiente una singola ulteriore alterazione genetica o epigenetica per sopprimere l'espressione di oncosoppressori.



La perdita di eterozigosi può essere rinvenuta in numerosi loci genici ma solo per alcuni è stata dimostrata, ad oggi, una forte associazione con la CIN; fra questi il più importante, presente in circa il 70% delle neoplasie colo-rettali, è

rappresentato da 18q, dove sono stati identificati diversi geni plausibilmente coinvolti nella carcinogenesi.²⁰

Il primo gene ad essere individuato fu, nel 1990, DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma), codificante per il recettore trans-membrana della netrina-1, che induce apoptosi in assenza del ligando. Il suo ruolo come oncosoppressore tradizionale è stato a lungo dibattuto, ma recentemente è stata dimostrata la sua capacità, quando mutato, di promuovere la sopravvivenza cellulare e la progressione tumorale.^{38,39} Sette anni più tardi vennero identificati i geni SMAD2 e 4, coinvolti nella via di signaling di TGF- β . Quando il fattore di crescita lega al TGF- β R2, quest'ultimo forma un complesso dimerico con TGF- β R1, il quale fosforila le proteine del gruppo SMAD che si complessano e migrano nel nucleo per attivare l'espressione di geni pro-apoptotici e regolatori del ciclo cellulare.³⁴

Altri loci colpiti da perdita di eterozigosi che mostrano un'associazione con CIN sono rappresentati da 5q e 17p, i quali portano alla perdita di espressione rispettivamente di APC e di TP53.^{40,41}

L'ultimo step è rappresentato dalla mutazione di TP53, determinante per l'acquisizione di un fenotipo invasivo, come dimostrato dall'incidenza del 4-26% nei polipi adenomatosi e del 75% nei carcinomi.⁴² Questa, generalmente di tipo missenso, si localizza più frequentemente a livello dei codoni 175, 245, 248, 273 e 282 e colpisce un allele, mentre il secondo allele è più frequentemente affetto da una delezione, secondo il meccanismo della perdita di eterozigosi.^{34,43} TP53 è un onco-soppressore codificante per la p53, il cosiddetto “guardiano del genoma”, un fattore di trascrizione che attraverso l'induzione dell'espressione di geni quali DDB2, XPC, CDKN1A, GADD45A, PUMA e BAX regola processi come la riparazione dei danni al DNA, l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi.⁴⁴

La CIN è caratterizzata da aneuploidia, amplificazioni genomiche sub-cromosomiche e perdita di eterozigosi, e può originare da difetti della segregazione cromosomica, della stabilità dei telomeri e della riparazione dei danni al DNA, anche se manca ad oggi una completa comprensione dei

meccanismi genetici responsabili dello sviluppo di questa via.⁴² I carcinomi CIN sono più frequentemente localizzati a livello del colon sinistro.

1.4.2 INSTABILITÀ DEI MICROSATELLITI

L'instabilità dei microsatelliti (MSI) è responsabile di circa il 15% dei carcinomi sporadici e dell'insorgenza di CCR nella HNPCC.

La MSI è una forma di instabilità genomica in cui la sequenza di DNA è soggetta ad un maggior tasso di mutazioni durante la replicazione cellulare, ed è caratterizzata dal silenziamento dell'espressione di geni come MLH1 (MutL Homolog), MSH2 e MSH6 (MutS Homolog), PMS1 e PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased), appartenenti al sistema MMR. Questi geni sono coinvolti nella correzione di errate inserzioni, delezioni e sostituzioni che si verificano durante la replicazione del DNA e sfuggono al processo di correzione di bozze.⁴⁵ La proteina MSH2 può complessarsi con MSH6 o MSH3, dando origine rispettivamente ad un eterodimero MutS α , in grado di riconoscere singole sostituzioni nucleotidiche, piccole delezioni o inserzioni, oppure a MutS β , che riconosce delezioni o inserzioni di maggiori dimensioni. Questi, a loro volta, reclutano gli eterodimeri MutL α , MutL β or MutL γ (a seconda che MLH1 si complessi con PMS2, PMS1 o MLH3) e formano un complesso MutS-MutL, consistente in una sliding clamp che taglia il segmento erroneamente replicato sul filamento figlio permettendo alla DNA polimerasi e alla DNA ligasi di correggere l'errore della replicazione.⁴⁶

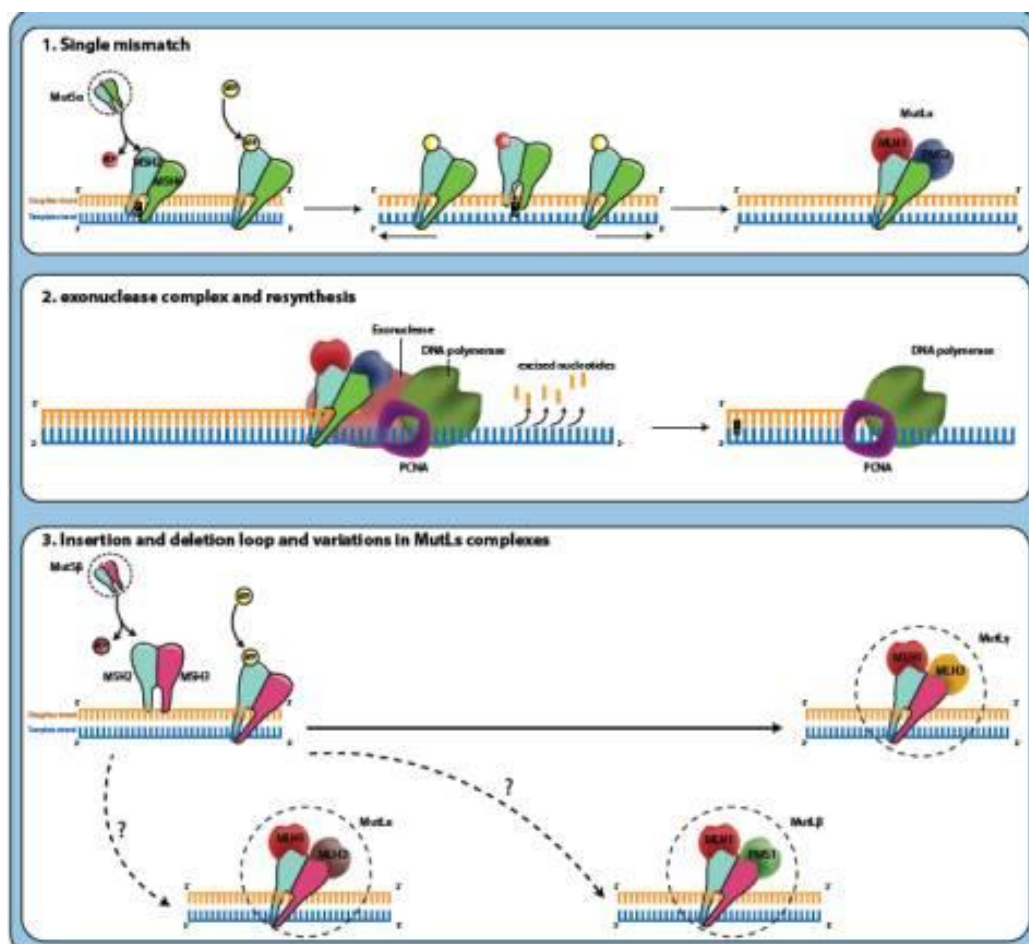
Più dell'80% dei carcinomi MSI sporadici mostrano iper-metilazione del promotore di MLH1, suggerendo che quest'evento epigenetico possa essere fondamentale nella patogenesi.⁴⁷

I microsatelliti sono delle brevi sequenze nucleotidiche di 1-6 bp ripetute in tandem, distribuite lungo tutto il genoma ogni circa 25-50 kbp sia in regioni codificanti che non. Possono essere monomorfici, quando il numero di ripetizioni è conservato fra diversi individui, e polimorfici quando questo numero varia inter-individualmente.⁴⁸⁻⁵⁰

Fisiologicamente i microsatelliti sono maggiormente soggetti a mutazioni rispetto alle altre sequenze genomiche a causa di un fenomeno di slippage

mediato dalla DNA polimerasi, che conduce ad un'espansione o più raramente ad una contrazione nucleotidica; questo evento si accentua nell'instabilità dei microsatelliti.⁵¹

Poiché la maggior parte di essi risiede in sequenze non codificanti è verosimile che molte di queste mutazioni non abbiano un significato funzionale. Alcune, tuttavia, si localizzano a livello di esoni codificanti, più frequentemente nei geni per TGF- β R2, IGFR2, BAX, E2F-4, TCF-4, caspasi 5, CDX2 e addirittura sugli stessi MSH3 e MSH6, favorendo un meccanismo a feedback positivo in cui il tumore MSI promuove il suo fenotipo.⁵²⁻⁵⁹



I CCR possono essere definiti MSI attraverso l'utilizzo del pannello di Bethesda, costituito dall'analisi di ripetizioni di sequenze mono- e di-nucleotidiche quali BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, e D17S250, come raccomandato nel 1998 in seguito ad un workshop del National Cancer Institute sull'instabilità microsatellitare. Su tale base i carcinomi vengono classificati come MSI-H (High Frequency MSI) se mostrano più di 2 marker mutati, MSI-L (Low

Frequency MSI) se uno solo e MSS (Microsatellite Stability) se non mostrano marker di instabilità; fra MSI-L e MSS non si individuano sostanziali differenze da un punto di vista clinico-patologico circa parametri quali sito del tumore, stadio, sesso, ploidia, istologia e outcome clinico, mentre queste sono più accentuate considerando la differenza fra MSI-H e le altre due categorie.⁶⁰

Generalmente, i carcinomi MSI originano da lesioni serrate, mostrano un'istologia mucinosa o indifferenziata, infiltrati linfocitari peritumorali ed insorgono più frequentemente nel colon destro.^{60,61}

1.4.3 FENOTIPO METILATORE DELLE ISOLE CPG

Il fenotipo metilatore delle isole CpG (CIMP) è una forma di instabilità epigenetica caratterizzata da diffusa ipermetilazione a carico di sequenze dinucleotidiche citosina-guanina, particolarmente ricche nei promotori genici. L'aggiunta di un gruppo metilico sul carbonio 5 di una citosina comporta silenziamento trascrizionale, quando localizzata in un promotore; questa metilazione potrebbe, inoltre, essere associata ad attivazione trascrizionale se ubicata a livello del gene vero e proprio.⁶²⁻⁶⁴

Diversi geni sono stati identificati come bersagli del CIMP, il significato di alcuni dei quali è ancora ignoto. Frequente è l'associazione del fenotipo CIMP con quello MSI, caratterizzato nella maggior parte dei casi dalla mutazione di MLH1 e BRAF, mentre nel caso di un CIMP MSS si rinviene sovente mutazione di KRAS.⁶⁵ Di conseguenza, i carcinomi MSI e quelli CIMP condividono diverse caratteristiche clinico-patologiche; localizzazione prossimale, istologia mucinosa e mutazione di BRAF sono state, tuttavia, confermate come caratteristiche proprie anche di CIMP, indipendentemente dall'eventuale associazione con instabilità microsatellitare.⁶⁵⁻⁷³

Ad oggi mancano ancora sufficienti evidenze circa quali loci genici debbano essere usati per definire uno stato di CIMP: la maggior parte degli studi condividono l'utilizzo di un pannello costituito da MLH1, p16, MINT1, MINT2 e MINT31; su questa base i CCR possono essere classificati come CIMP-0 se non mostrano nessun marker mutato, CIMP-L (CIMP-Low) se fino a 3 e CIMP-H (CIMP-High) se più di 4 di questi marker. Numerosi sono gli altri loci

oggetto di studi la cui implementazione nella pratica clinica potrebbe, oltre ad aiutare a comprendere i meccanismi patogenetici responsabili di questa via, favorire lo sviluppo di nuove classificazioni molecolari del CCR con migliori correlazioni prognostiche e terapeutiche.⁷²⁻⁷⁵

È importante sottolineare come queste vie non siano mutualmente esclusive, infatti non è raro individuare neoplasie che mostrano caratteristiche comuni a più vie: oltre alla frequente coesistenza dei fenotipi MSI e CIMP, fino al 25% dei carcinomi MSI possono mostrare anomalie cromosomiche, mentre fino al 12% dei carcinomi CIN mostrano instabilità dei microsatelliti.⁴²

1.5 VIE CLINICO-PATOLOGICHE

Coerentemente con questi modelli genetici sembrano esistere almeno tre vie clinico-patologiche nell'evoluzione dei CCR sporadici, correlate a specifici quadri isto-morfologici.^{76,77}

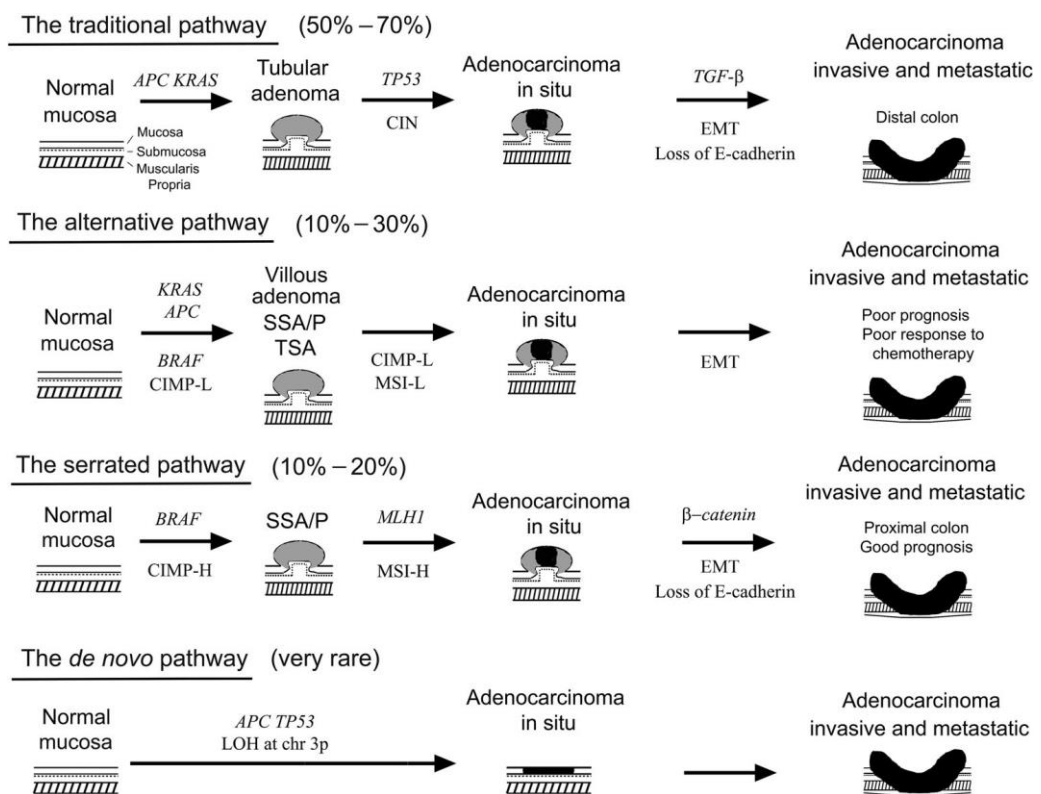
La più frequente, costituente il 50/70% dei casi, è la via tradizionale in cui attraverso la formazione di un adenoma tubulare, via mutazione di APC e KRAS, origina il classico CCR distale che esibisce CIN e mutazione di TP53. L'evoluzione attraverso questa via è lenta, impiegando dai cinque ai vent'anni, ed è stato proposto che la neoplasia origini da cellule ben differenziate a livello della porzione apicale delle cripte, con tendenza ad una crescita luminale.^{77,78}

La via alternativa, responsabile del 10/30% dei casi, è caratterizzata da maggior eterogeneità genetica rispetto alle altre due vie. Può originare da adenomi villosi e, forse, anche da adenomi serrati sessili e serrati tradizionali, attraverso mutazione di KRAS, BRAF, APC e un fenotipo CIMP-low, dando vita a CCR caratterizzati da peggior prognosi e risposta alla chemioterapia.

Meno frequente è la via serrata, coinvolta nel 10/20% dei casi, che attraverso la formazione di adenomi serrati perlopiù sessili e la mutazione di BRAF, MLH1 e i fenotipi MSI-H e CIMP-H dà origine a CCR localizzati prossimalmente e con miglior prognosi rispetto alle altre vie. Le cellule originarie potrebbero essere localizzate più profondamente rispetto alla via tradizionale, con tendenza ad una crescita profonda ed una maggior velocità evolutiva.⁷⁹⁻⁸²

A queste tre vie se ne potrebbe aggiungere almeno un'altra, molto rara, la via "de novo", caratterizzata dall'assenza di lesioni precursore e dalla mutazione di APC e TP53, associate a KRAS wild-type e LOH 3p.⁸³⁻⁸⁶

Indipendentemente dalla via coinvolta, l'acquisizione di capacità invasiva e metastatica, rappresentante gli stadi finali della cancerogenesi, sembra essere correlata ad un processo di transizione epitelio-mesenchimale. Questo fenomeno è caratterizzato dalla perdita di molecole d'adesione, come E-caderine e proteina ZO-1, e dall'espressione di marker mesenchimali, come vimentina e N-caderine, grazie ai quali le cellule tumorali acquisiscono un fenotipo simil-fibroblastico.



1.6 ISTOPATOLOGIA

Un carcinoma colo-rettale viene definito invasivo quando infiltra la tonaca sottomucosa. Questa caratteristica lo distingue dagli altri carcinomi del tubo digerente, che diventano invasivi con l'infiltrazione della lamina propria; questa distinzione è secondaria all'assenza di vasi linfatici nella tonaca mucosa del colon e del retto. Per questo motivo un carcinoma infiltrante la lamina propria o la muscolaris mucosae, definito carcinoma intramucoso, ha scarso o nullo potenziale metastatico.

La maggior parte dei CCR (>90%) sono adenocarcinomi, definiti dalla presenza di strutture ghiandolari. Sono generalmente costituiti da alte cellule cilindriche, simili a quelle degli adenomi, determinano un'intensa reazione desmoplastica stromale e presentano tipicamente materiale necrotico nel lume ghiandolare. Il sistema grading degli adenocarcinomi, secondo la classificazione WHO dei tumori del tratto digerente del 2010, è basato sulla percentuale di volume neoplastico interessato da formazioni ghiandolari:⁸⁷

- Ben differenziato: >95% della neoplasia
- Moderatamente differenziato: 50-95% della neoplasia
- Scarsamente differenziato: 5-50% della neoplasia
- Indifferenziato: <5% della neoplasia

Esistono inoltre 6 sottotipi di adenocarcinoma, secondo questa classificazione.

Il più frequente (circa 5%) è rappresentato dall'adenocarcinoma mucinoso, definito dalla presenza di mucina extracellulare che interessa più del 50% del volume neoplastico. Sono caratterizzati da ampi laghi di mucina con cellule tumorali presenti sui bordi o nel contesto del materiale mucinoso, in piccoli aggregati. Gli adenocarcinomi mucinosi hanno generalmente una prognosi peggiore rispetto agli adenocarcinomi, a meno che non siano associati ad instabilità dei microsatelliti. Più rari sono invece l'adenocarcinoma midollare, micropapillare, cribriforme, a cellule ad anello con castone e serrato. Esistono anche degli istotipi carcinomatosi non ghiandolari come il carcinoma neuroendocrino, il carcinoma squamo-cellulare, il carcinosarcoma e il carcinoma indifferenziato.

1.7 CLINICA E DIAGNOSI

Molti pazienti sono asintomatici al momento della diagnosi, che viene effettuata grazie alle tecniche di screening.

La presentazione clinica è fortemente influenzata dalla localizzazione del tumore primitivo; la localizzazione più frequente è quella rettale (circa 30%), seguita da quella sigmoidea (circa 25%). Le neoplasie del colon prossimale tendono a presentarsi in maniera più insidiosa, con sintomi correlati ad anemia da stitico ematico cronico, calo ponderale e masse palpabili addominali. Una massima della pratica clinica prevede che ogni anemia sideropenica in un soggetto di sesso maschile di età avanzata o di sesso femminile in età post-menopausale sia considerata, fino a prova contraria, un segno di carcinoma gastrointestinale. Le neoplasie del colon distale, invece, possono manifestare una sintomatologia più florida, caratterizzata da alterazioni dell'alvo, sanguinamento (generalmente cronico e occulto, ma possibili anche enterorragia, ematochezia e proctorragia, soprattutto nelle neoplasie rettali), dolore in fossa iliaca sinistra, occlusione intestinale, tenesmo rettale.

I principali esami strumentali usati per la diagnosi sono la Tc (colonscopia virtuale) e l'endoscopia. Quest'ultima resta tutt'ora il gold standard, offrendo la possibilità di applicare tecniche cromoendoscopiche per la rapida caratterizzazione di lesioni piatte, di prelevare campioni biotici per l'esame istologico ed avendo inoltre un ruolo terapeutico grazie alla possibilità di eseguire mucosectomie e polipectomie.

L'introduzione di efficaci tecniche di screening ha modificato la storia naturale del CCR, permettendo spesso la diagnosi precoce ad uno stadio di malattia in cui una resezione endoscopica può avere un effetto curativo. Fra queste tecniche la più utilizzata è il test del sangue occulto fecale, eseguito ogni due anni fra i 50 e i 69 anni, che consiste nella raccolta, presso il domicilio, di un campione di feci nel quale vengono ricercate tracce microscopiche di sangue. Il test tradizionale (al guaiaco) cerca la presenza di eme, mentre test più recenti ricercano sostanze come globina, DNA, transferrina o porfirina. Un'alternativa è rappresentata dall'esecuzione di una rettosigmoidoscopia, a partire dai 50 anni, con cadenza

quinquennale; il razionale di questo test consiste nel fatto che la maggior parte delle neoplasie (sia benigne che maligne) si sviluppano in quest'area.

La positività di uno di questi test costituisce indicazione all'esecuzione di una colonscopia. Questa può essere altresì impiegata come indagine di primo livello, in accordo con la volontà del paziente e a cadenza decennale, oppure con una maggiore frequenza in pazienti con parenti di primo grado affetti da polipi o carcinomi coloretali, pazienti affetti da malattia infiammatoria cronica intestinale o da sindromi genetiche associate a CCR.

1.8 STADIAZIONE

Lo stadio di malattia è il più importante predittore di sopravvivenza nei pazienti affetti da CCR, e su di esso si basa la scelta del protocollo terapeutico. Il sistema standard è attualmente rappresentato dall'ottava edizione del TNM della UICC;

I parametri valutati sono:

- pT: l'estensione locale della neoplasia. Viene suddivisa in T1 (invasione della sottomucosa), T2 (invasione della muscolare propria), T3 (invasione dei tessuti sottosierosi o dei tessuti peri-colici e peri-rettali non rivestiti da peritoneo), T4a (invasione del peritoneo viscerale) e T4b (invasione degli organi o delle strutture anatomiche circostanti).
- pN: l'estensione linfonodale della neoplasia. Viene suddivisa in N0 (nessun interessamento), N1a (1 linfonodo loco-regionale interessato), N1b (2-3 linfonodi interessati), N1c (nessuna positività linfonodale ma rinvenimento di depositi neoplastici sub-sierosali, mesenterici o nei tessuti non peritoneali peri-colici, peri-rettali o meso-rettali), N2a (interessamento di 4-6 linfonodi loco-regionali) e N2b (più di 6 linfonodi interessati). Fondamentale, ai fini di una corretta stadiazione, è l'escissione chirurgica di almeno 12 linfonodi. Un maggior numero di linfonodi asportati è ritenuto correlato ad una miglior prognosi, verosimilmente grazie ad uno staging più accurato.
- pM: l'estensione sistemica della neoplasia. Viene suddivisa in M0 (assenza di metastasi), M1a (presenza di metastasi in un organo o sito anatomico, in assenza di carcinosi peritoneale), M1b (metastasi in due

organi e/o siti anatomici, in assenza di coinvolgimento peritoneale) e M1c (presenza di carcinosi peritoneale, associata o meno a metastasi in altre sedi).

Sulla base di questi 3 parametri i pazienti vengono suddivisi in 4 stadi; questa stadiazione, oltre a definire la prognosi, guida anche il trattamento della neoplasia.

I: T1/2, N0, M0 con Overall Survival Rate (OSR)-5-years >90%.

Rimozione endoscopica oppure chirurgica (se la neoplasia è di alto grado, se la rimozione endoscopica risulta impossibile a causa delle dimensioni o se i margini del polipo cancerizzato, rimosso endoscopicamente, sono infiltrati).

II: T3/4, N0, M0; suddiviso a sua volta in IIA (T3), IIB (T4a) e IIC (T4b), con OSR-5-years 55/85%.

Se la neoplasia è colica si tratta con rimozione chirurgica ed eventualmente chemioterapia adiuvante, in presenza di fattori di rischio di recidiva (ostruzione, perforazione, coinvolgimento peritoneale, alto grado, invasione linfovaskolare, istologia mucinosa, linfadenectomia insufficiente, R1/2). Non tutti gli autori concordano circa i fattori per avviare una chemioterapia.

Se la neoplasia è rettale il trattamento standard è rappresentato dalla chemioradioterapia neo-adiuvante, seguita da chirurgia e chemioterapia adiuvante.

III: T1/4, N1/2, M0; suddiviso in IIIA (se T1-2, N1 o T1, N2a), IIIB (Se T3-4a, N1 o T2-3, N2a o T1-2, N2b) e IIIC (T4a, N2a o T3-4a, N2b o T4b, N1-2), con OSR-5-years 20/55%.

Se la neoplasia è colica, la maggior parte dei pazienti va incontro ad exeresi chirurgica seguita da chemioterapia adiuvante; gli schemi più usati sono FOLFOX (5-FU, acido folinico e oxaliplatino) e XELOX (capecitabina e oxaliplatino). Radioterapia e chemioterapia possono essere impiegate, da sole o in combinazione, in pazienti non operabili.

Se la neoplasia è rettale, chemioradioterapia neo-adiuvante e chemioterapia adiuvante rappresentano, come per lo stadio 2, lo standard terapeutico.

IV: T1/4, N0/2, M1; suddiviso a sua volta in IVA (M1a), IVB (M1b) e IVC (M1c), con OSR-5-years 5%.

La maggior parte dei pazienti riceve chemioterapia e/o targeted therapies come FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, FOLFOXIRI, bevacizumab, panitumumab, cetuximab.

La chirurgia può essere impiegata, su pazienti altamente selezionati e seppur raramente con intenti curativi, sia sul sito del tumore primitivo sia su polmone e fegato metastatici. In alternativa, le metastasi epatiche possono essere trattate con ablazione, embolizzazione, o chemio-infusione arteriosa epatica. La chirurgia trova applicazione anche nel trattamento di ostruzioni coliche, attraverso colectomia parziale oppure colostomia permanente. In alternativa, le occlusioni possono essere trattate mediante stent, posizionati endoscopicamente.

Anche la radioterapia può essere utilizzata con intenti palliativi, soprattutto nelle recidive di carcinomi rettali.

1.9 FATTORI PROGNOSTICI

La prognosi di un CCR viene valutata attraverso lo studio di diverse caratteristiche, fra cui la più importante continua ad essere rappresentata dallo stadio di malattia secondo il sistema TNM. Ciò nonostante, non è infrequente l'osservazione di diversa prognosi e risposta alla terapia in pazienti allo stesso stadio; per questo motivo nuovi fattori prognostici sono attualmente oggetto di numerosi studi.

- TNM: inizialmente sviluppato esclusivamente come fattore prognostico, ad oggi viene utilizzato anche per la scelta del trattamento e per l'arruolamento nei trial clinici.
- Numerosi parametri clinici sono stati proposti, ma manca ad oggi un consenso generale circa la loro affidabilità. Fra questi i più importanti sono il Performance Status misurato secondo la scala della ECOG,

lattico-deidrogenasi, fosfatasi alcalina, albumina, transaminasi epatiche, emoglobina, leucociti, piastrine e marker tumorali (CEA e CA 19-9)

- Carcinosi peritoneale
- Grading
- Istologia: gli istotipi mucinoso (se non associato a MSI-H) e con cellule ad anello con castone sono associati ad una prognosi peggiore e ad una minore risposta alla terapia farmacologica.
- Invasione linfo-vascolare: è uno step cruciale per la disseminazione metastatica.
- Budding tumorale: è una transizione, sul margine invasivo, da strutture ghiandolari a cellule singole/piccoli cluster cellulari con proprietà staminali, correlata a un maggior rischio di recidiva e metastasi.
- Configurazione del margine di crescita tumorale (espansivo vs infiltrativo).
- MSI-H: è associata a tumori prossimali, scarsamente differenziati, mucinosi, con marcato infiltrato linfocitario e frequenti mutazioni di BRAF e TGF- β 2. Generalmente i CCR MSI-H mostrano una migliore sopravvivenza nel tempo, a fronte di una minore risposta alla terapia adiuvante a base di 5-FU.
- LOH18q: presente nel 70% dei CCR, probabilmente attraverso la perdita del gene DCC, è correlata ad una peggior prognosi.
- Immunità tumorale: la densità dell'infiltrato, la tipologia e la localizzazione (intra- vs peri-tumorale) sono state associate a una migliore sopravvivenza libera da malattia e complessiva, e mostrano inoltre un'associazione inversa con lo stadio di malattia.
- Marker immunoistochimici: importante è l'analisi dell'espressione del VEGF, che nel CCR è stato associato ad aggressività biologica, ridotta sopravvivenza libera da malattia e complessiva, diffusione metastatica e scarsa risposta alla radioterapia neo-adiuvante. Il bevacizumab, un anticorpo monoclonale anti-VEGF, è stato

approvato per il trattamento del CCR metastatico in associazione al 5-FU. L'EGFR, un altro dei marker proteici più studiati, è stato associato a una peggiore prognosi. Numerosi farmaci anti-EGFR, come cetuximab, panitumumab e gefitinib, sono stati approvati per la terapia del CCR metastatico con EGFR wild-type.

2 – BUDDING

2.1 BUDDING

Il budding è un distacco di singole cellule o cluster fino a 4 cellule nello stroma sul fronte invasivo di un carcinoma, che può essere localizzato anche in sede intra-tumorale. In passato sono state usate anche definizioni con cluster fino a 5 cellule, ma la recente introduzione del concetto di Poorly Differentiated Cluster (PDC - cluster composti da almeno 5 cellule, senza un'evidente differenziazione ghiandolare) giustifica l'abbassamento del cut-off per distinguere le diverse entità istopatologiche, non essendo il valore prognostico del budding influenzato dal numero di cellule definenti il cluster.⁸⁸

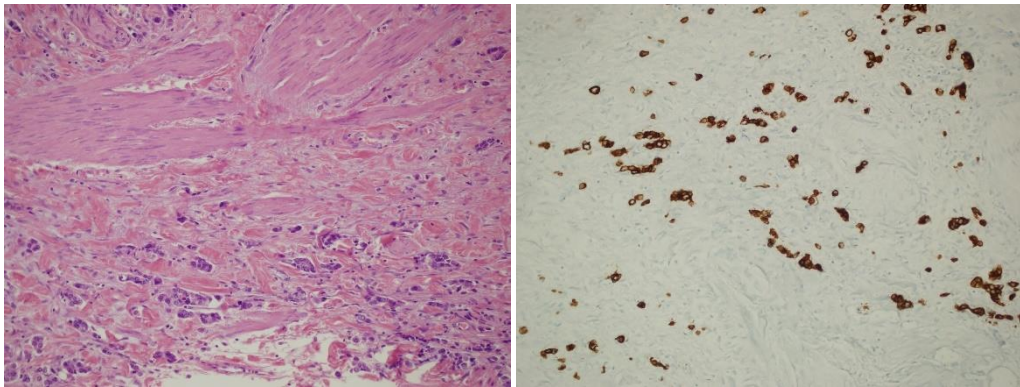


Figure 1 e 2: Immagini ad ingrandimento x20 del fronte invasivo rappresentanti un elevato grado di budding (>10 bud), rispettivamente, in ematossilina-eosina e anticorpi anticitocheratine CAM5.2.

Nonostante sia stato studiato principalmente nei CCR, il budding è stato rinvenuto in numerose altre discariocinesi epiteliali come carcinomi esofagei, laringei, mammari, polmonari, pancreatici, ampollari, anali, del piccolo intestino e colangiocarcinomi.⁸⁹⁻⁹¹

È ritenuto dalla maggior parte degli autori una forma di transizione epiteliomesenchimale in cui diversi eventi molecolari portano ad una perdita delle interazioni cellula-cellula e dell'adesione intercellulare, sfociando nella trasformazione da epitelio sano a fenotipo invasivo e potendo culminare nella disseminazione metastatica. Il budding, infatti, è frequentemente rinvenuto in neoplasie caratterizzate da attivazione costitutiva della via di signaling WNT, di TGF- β e di vie associate a recettori tirosin-chinasici come RAS e RAF. I bud mostrano inoltre enzimi necessari per la migrazione stromale, come

metalloproteinasi e catepsine, e resistenza ad apoptosi, chemioterapici e morte cellulare immunogenica grazie alla ridotta espressione di caspasi e proteina RKIP. Per questi motivi il budding è generalmente associato ad un elevato rischio di interessamento linfonodale, disseminazione metastatica, recidiva locale e a distanza e aggressività biologica.⁹⁰

Recente è l'ipotesi secondo cui budding e PDC rappresentino fasi sequenziali della crescita e della disseminazione tumorale, supportata dalla loro frequente compresenza, dall'evidente somiglianza morfologica, dalla localizzazione sul fronte invasivo e dalla dimostrata condivisione di fattori morfogenetici associati alla transizione epitelio-mesenchimale (quali l'attivazione costitutiva della via di signaling WNT/ β -catenina, l'espressione di metalloproteinasi e L1CAM e la ridotta espressione di E-caderine).⁹²⁻⁹⁴ I PDC rappresenterebbero, quindi, l'evoluzione dei bud. Alcuni studi, basandosi su questa correlazione, hanno elaborato dei nuovi sistemi di grading, combinando la valutazione di budding e PDC sul fronte invasivo in un unico score, che ha mostrato una buona associazione con l'OSR-5-years e la probabilità di metastasi linfonodali.^{91,95,96}

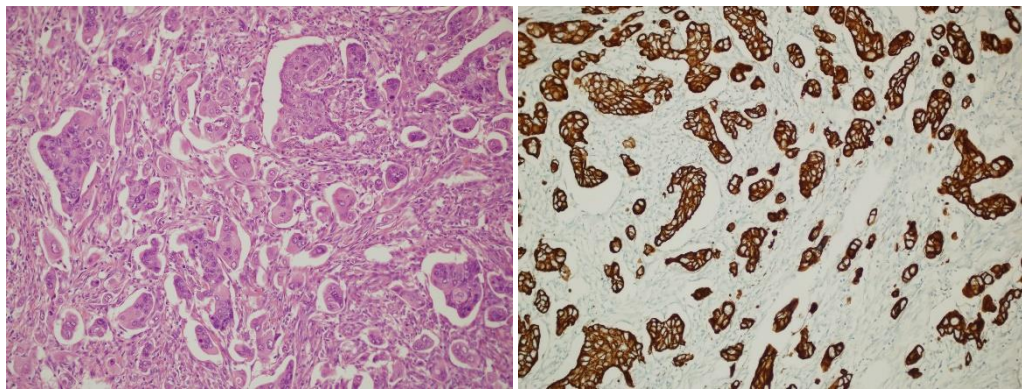


Figure 3 e 4: Immagini ad ingrandimento x20 rappresentanti un elevato grado di PDC (>10 cluster) con le due colorazioni.

Nonostante il valore prognostico del budding sia noto da decenni, la sua valutazione e l'utilizzo nella pratica clinico-diagnostica non sono ancora, ad oggi, universalmente diffusi. Pur restando il TNM il gold standard nella suddivisione dei pazienti in categorie prognostiche, l'implementazione nella routine anatomico-patologica del budding, così come quella dei PDC e di altri nuovi parametri, potrebbe contribuire ad una più precisa stratificazione del

rischio nei pazienti affetti da CCR. Il suo ruolo potrebbe essere cruciale in tre specifici scenari clinici:⁸⁸

- Nei CCR pT1 asportati endoscopicamente la presenza di bud indica un maggior rischio di interessamento linfonodale, e quindi aiuta a selezionare i pazienti candidabili ad un intervento chirurgico.
- Nei pazienti in secondo stadio la presenza di bud è stata correlata ad una minor sopravvivenza libera da malattia. Non è infrequente osservare pazienti in secondo stadio con un decorso peggiore di pazienti in terzo stadio; potrebbe quindi aiutare a selezionare i pazienti candidabili ad una terapia adiuvante.
- Nelle biopsie preoperatorie il rinvenimento di budding potrebbe aiutare a selezionare i pazienti candidabili ad una terapia neo-adiuvante.

2.2 METODI DI VALUTAZIONE DEL BUDDING

La prima descrizione del concetto di budding nella letteratura risale al 1954, con la pubblicazione da parte di Imai et al. di un sistema di stadiazione per neoplasie maligne basato su tre parametri: invasione linfo-vascolare, desmoplasia peritumorale e quello che venne allora descritto come “sprouting” (germinazione) sul fronte invasivo che, secondo gli autori, rifletteva un più rapido tasso di crescita tumorale.⁹⁷

Sebbene inizialmente non destò grande interesse nella comunità scientifica, in seguito alla maggiormente dettagliata descrizione di questo fenomeno da parte di Gabbert et al. nel 1985, che definivano come “un’evidente dissociazione dei complessi organizzati di cellule tumorali in cellule isolate, unitamente alla perdita della maggior parte delle caratteristiche citologiche di differenziazione”,⁹⁸ e alle contemporanee pubblicazioni di Yokoyama, Hayashida (cui si riconosce l’introduzione del termine “budding”) e Morodomi, che dimostrarono come fosse fortemente associato alla disseminazione linfonodale nei carcinomi gastrici e colon-rettali,⁹⁹⁻¹⁰¹ iniziarono diversi studi volti alla validazione come fattore prognostico, all’individuazione di criteri valutativi e alla caratterizzazione morfologico-molecolare del budding. Fondamentale fu, a questo scopo, il lavoro di Hase et al. che nel 1993

dimostrarono l'associazione del budding con diversi fattori prognostici negativi clinico-patologici come grado e stadio tumorale, invasione linfo-vascolare e peri-neurale e un peggior OSR a 5 e 10 anni, oltre a proporre il primo sistema valutativo, basato sull'individuazione del pattern predominante fra nessuno, lieve, moderato e severo e sulla successiva suddivisione in BD-1 (nessuno o lieve) e BD-2 (moderato o severo) come categorie, rispettivamente, di basso e alto rischio. Questa metodica è basata sull'impressione soggettiva e risente, quindi, di una scarsa riproducibilità intra- e soprattutto inter-osservatore.¹⁰²

Da allora sono state proposte diverse metodiche di analisi:

Ueno et al. proposero nel 2002 e nel 2004 due sistemi quantitativi per la valutazione, rispettivamente, di CCR in fase avanzata e precoce. Per i primi il conteggio va effettuato in un'area di 0,385 mm² (x25) con suddivisione in due categorie (basso grado < 10, alto grado ≥ 10).¹⁰³ Per i CCR precoci, invece, il conteggio viene effettuato in un'area di 0,785 mm² con cut-off stabilito a 5 bud.¹⁰⁴

Nakamura et al. proposero nel 2005 un sistema semi-quantitativo, applicabile solo agli stadi avanzati di CCR, riprendendo la suddivisione in due categorie e i quattro pattern descritti da Hase, definendoli tuttavia con maggior precisione: il pattern lieve identifica un fronte invasivo interessato per meno di 1/3 dal budding, quello moderato fra 1/3 e 2/3, quello severo è interessato per più di 2/3.^{105,106}

Wang et al. proposero nel 2009 due nuovi sistemi per la valutazione del budding in CCR al secondo stadio, rappresentati dal metodo convenzionale e dal metodo rapido. Nel primo i vetrini vengono inizialmente scansionati a basso ingrandimento (x40) per identificare l'area con la maggior densità di bud, sulla quale effettuare poi il conteggio ad alto ingrandimento (x200, su un'area di 0,94985 mm²). Nei casi in cui non si identifica l'area a basso ingrandimento il conteggio viene effettuato su cinque aree selezionate casualmente, riportando la mediana del conteggio. Il metodo rapido differisce per la tecnica di valutazione ad alto ingrandimento, nella quale, anziché effettuare un conteggio, si definisce più semplicemente l'area come positiva (≥1 bud) o negativa per budding. Questo

viene poi refertato come di alto grado, se presente in più del 50% delle aree osservate, o di basso grado.¹⁰⁷

Karamitopoulou et al. proposero nel 2013 il sistema dei 10 HPF che, a differenza dei precedenti metodi, prevede una colorazione per pan-citocheratina con anticorpi AE1/AE3. I vetrini vengono inizialmente scansionati ad ingrandimento panoramico (x5), per selezionare quello con la maggiore densità di budding peritumorale. Successivamente viene effettuato il conteggio, ad un più alto ingrandimento (x40), su 10 aree selezionate casualmente e i casi vengono stratificati in due categorie (alto e basso grado) con cut-off stabilito a 10 bud. Anche questo metodo è applicabile ai CCR al secondo stadio.¹⁰⁸

Il sistema ritenuto, ad oggi, lo standard per la valutazione del budding è il metodo dell'hotspot, come raccomandato da Lugli et al. in seguito alla International Tumor Budding Consensus Conference del 2016. Prima di scansionare i vetrini è necessario conoscere il diametro del campo di osservazione ad ingrandimento x20, per rapportare l'area valutata con l'area standard di 0,785 mm². Inizialmente è necessario selezionare il vetrino (in ematossilina-eosina) con la maggior densità di bud, poi si scansionano su di esso 10 aree ad ingrandimento x10 per identificare l'hotspot. Nelle neoplasie pT1 reseccate endoscopicamente, non essendo generalmente disponibile sufficiente materiale, è necessario scansionare tutto il vetrino. In seguito, si effettua nell'hotspot il conteggio ad ingrandimento x20 e si divide il risultato per un fattore di normalizzazione, per determinare la conta su 0,785 mm². Il caso viene, infine, incluso in una fra le categorie Bd1 (low; <5 bud), Bd2 (intermediate; 5-9 bud) e Bd3 (high; ≥10 bud).⁸⁸

Figure 5 e 6: Immagini tratte dall'articolo "Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016", Lugli et al. (2017) che descrivono il metodo dell'hotspot.

Objective magnification: 20		
Eyepiece FN Diameter (mm)	Specimen Area (mm ²)	Normalization Factor
18	0.636	0.810
19	0.709	0.903
20	0.785	1.000
21	0.866	1.103
22	0.950	1.210
23	1.039	1.323
24	1.131	1.440
25	1.227	1.563
26	1.327	1.690

$$\text{Tumor bud count per } 0.785 \text{ mm}^2 = \frac{\text{Bud count (20x objective)}}{\text{Normalization factor}^*}$$

Bd1 (low):	0-4 buds	} per 0.785 mm ²
Bd2 (intermediate):	5-9 buds	
Bd3 (high):	≥10 buds	

Reporting example:

Tumor budding: Bd3 (high), count 14 (per 0.785 mm²)

3 – OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il budding tumorale è un fattore prognostico riconosciuto e sempre più studiato nel carcinoma del colon-retto, associato ad un elevato rischio di metastasi linfonodali e a distanza, di recidiva di malattia e più in generale ad avversi outcome clinici. Nonostante la recente pubblicazione di un metodo di valutazione standardizzato, basato sull'evidenza e su un consenso internazionale dei più importanti autori dell'argomento, persistono alcuni dubbi circa l'applicazione di questo fattore nella pratica clinico-patologica; l'utilizzo dell'immunoistochimica è uno degli aspetti più dibattuti: alcuni autori ne limitano l'utilizzo ai casi di più difficile valutazione per motivi di costo-efficacia, mentre altri affermano che potrebbe migliorare l'accuratezza del conteggio, se utilizzata abitualmente. Abbiamo quindi deciso di valutare la riproducibilità inter ed intra-osservatore con le due colorazioni, ematossilina-eosina ed anticorpi anti-citocheratine CAM5.2,^{90,109,110} per valutare se quest'ultima apportasse effettivamente dei vantaggi rispetto alla colorazione tradizionale.

Abbiamo, inoltre, valutato la possibilità di integrare il BT nel grading del carcinoma colo-rettale. È noto, nella comunità scientifica, che l'attuale sistema di grading presenta diverse debolezze, come un'eccessiva soggettività nella valutazione, l'incerto valore prognostico e l'inapplicabilità nei più rari sottotipi di adenocarcinoma. Abbiamo quindi confrontato tre nuovi sistemi (Lee 2018, Backes 2018 ed Arpa 2019), tutti basati sull'unione del grading di BT e dei Poorly Differentiated Clusters, con quello tradizionale.

4 – MATERIALI E METODI

4.1 SELEZIONE DEI CAMPIONI

Per questo studio sono stati selezionati 100 pazienti, operati presso l'Ospedale Policlinico IRCCS San Martino fra il 4-08-2005 e il 16-05-2012, in modo tale da rappresentare in modo equo il II e III stadio e la localizzazione destra vs sinistra della neoplasia. La casistica risulta, pertanto, composta da 50 pazienti in stadio II (tutti allo stadio IIA) ed altrettanti in stadio III (41 IIIA e 9 IIIC), e per ciascuno stadio sono stati selezionati 25 pazienti con malattia del lato destro (colon cieco, ascendente e trasverso) e 25 del lato sinistro (colon discendente, sigma o retto). Gli istotipi mucinoso, con cellule ad anello con castone, midollare e micropapillare sono stati esclusi a causa della maggior difficoltà nel riconoscere i buds.⁸⁸ Nessun paziente, inoltre, ha ricevuto una terapia neo-adiuvante.

4.2 RACCOLTA DEI DATI CLINICI

Per ogni paziente sono stati raccolti i seguenti dati clinici: età all'intervento, sesso, sede di malattia, numero di linfonodi rinvenuti, stadio clinico alla diagnosi, sopravvivenza globale, sopravvivenza libera da malattia, data della prima eventuale recidiva, eventuale esecuzione di terapia adiuvante, eventuale decesso e causa del decesso.

4.3 COLORAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA

Le colorazioni immunoistochimiche sono state effettuate con immunocoloritore automatico BenchMark Ultra (Ventana Medical System, Tucson Arizona) con smascheramento antigenico mediante Proteinase 1 e con sistema perossidasi-antiperossidasi utilizzando come substrato la 3-3' diaminobenzidina.

4.4 ESAME ISTOLOGICO

Per la valutazione del budding è stato utilizzato il metodo raccomandato dalla ITBCC, identificando l'hotspot, studiandolo ad ingrandimento x20 e contando i buds in esso contenuti. Il bud è stato definito come un raggruppamento di 1-4 cellule infiltrante lo stroma, localizzato sul fronte invasivo.

I casi sono stati valutati retrospettivamente da tre operatori, di cui due anatomicopatologi esperti in patologia gastro-intestinale ed un giovane patologo durante il dottorato di ricerca, con nessuna conoscenza circa l'outcome clinico e le valutazioni degli altri osservatori. Ogni caso è stato studiato su due vetrini

comprendenti il fronte invasivo, colorati rispettivamente con ematossilina-eosina e anticorpi anti-citocheratina CAM5.2. Questi ultimi sono diretti contro citocheratine 7 e 8, presenti nella maggior parte delle neoplasie epiteliali, compreso il CCR. Per ciascun caso ogni operatore ha contato il numero di buds ed ha attribuito un punteggio da 1 a 3 (a seconda che il numero fosse <5, 5-9 o ≥ 10).

Abbiamo, inoltre, valutato l'efficacia prognostica di tre nuovi sistemi di grading, tutti basati sull'unione del grado di budding e PDC in un unico score: quello descritto da Lee et al.,⁹⁶ quello descritto da Backes et al.,⁹⁵ ed il Combined Invasive Front (CIF) descritto da Arpa et al.⁹¹

I Poorly Differentiated Clusters sono stati valutati utilizzando il metodo raccomandato da Ueno,¹¹¹ guardando il vetrino a basso ingrandimento per identificare l'hotspot, e studiando quest'ultimo con ingrandimento x20 per contare il numero di PDC. Il grado è stato assegnato, a seconda che il numero fosse <5, 5-9 o ≥ 10 , come 1, 2 o 3. Tale valutazione, insieme a quella del grading tradizionale, è stata effettuata esclusivamente da un osservatore (LM), e pertanto solamente i dati provenienti da quest'osservatore sono stati utilizzati per le analisi uni e multivariate. Il grading secondo i tre nuovi sistemi è stato definito attraverso i criteri indicati nella tabella 1.

Tabella 1: Confronto fra i tre nuovi sistemi di grading analizzati in questo studio.

Autore	Definizione di alto grado	Malattia e stadio di applicazione
Lee et al. (2018)	Bd3 + PDC3 Bd3 + PDC2 Bd2 + PDC3	Adenocarcinoma del colon stadio II
Backes et al. (2018)	Almeno uno fra Tb o PDC di grado 2-3	Adenocarcinoma colo-rettale pT1
Arpa et al. (2019)	Bd3 o PDC3	Adenocarcinoma del piccolo intestino associato a Malattia di Crohn (tutti gli stadi)

4.5 ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando IBM SPSS statistics 26. La riproducibilità inter ed intra-osservatore è stata valutata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman. La forza della correlazione

è stata classificata come molto alta con $\rho=0.900-1.000$, alta con $\rho=0.700-0.899$, moderata con $\rho=0.500-0.699$, bassa con $\rho=0.300-0.499$ e assente con $\rho=0.000-0.299$. Le analisi univariate sono state condotte attraverso il test del χ^2 e il test esatto di Fisher, per valutare l'eventuale associazione fra variabili categoriche e recidiva di malattia e morte CCR-correlata. Le analisi multivariate sono state condotte attraverso i modelli della regressione logistica e dei rischi proporzionali di Cox, per evidenziare potenziali fattori predittivi delle medesime variabili di outcome. Prima di eseguire il modello di Cox è stata verificata l'assunzione di proporzionalità dei rischi. Valori di $P<0.05$ sono stati considerati come statisticamente significativi. Le curve di sopravvivenza e sopravvivenza libera da recidiva sono state costruite attraverso il metodo Kaplan-Meier.

5 – RISULTATI

Tabella 2: *Principali dati clinico-patologici dei pazienti.*

Categoria	Numero di casi (n=100)
Età all'intervento (anni)	
<65	21
≥65	79
Sesso	
Maschile	52
Femminile	48
Sede di malattia	
Colon destro	50
Colon sinistro	21
Sigma	5
Sigma-retto	12
Retto	12
Terapia adiuvante	
Si	48
No	52
Numero di linfonodi resecati	
≥12	83
<12	17
Stadio	
II	50
IIIa	41
IIIc	9
Grading tradizionale	
1	0
2	90
3	9
4	1
Budding tumorale in E&E	
1	41
2	24
3	35
Budding tumorale in IIC	
1	37
2	17
3	46
PDC	
1	84
2	9
3	7
Grading sec. Lee et al.	
Low	87
High	13
Grading sec. Backes et al.	
Low	40
High	60
Grading sec. Arpa et al.	
Low	63
High	37

5.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

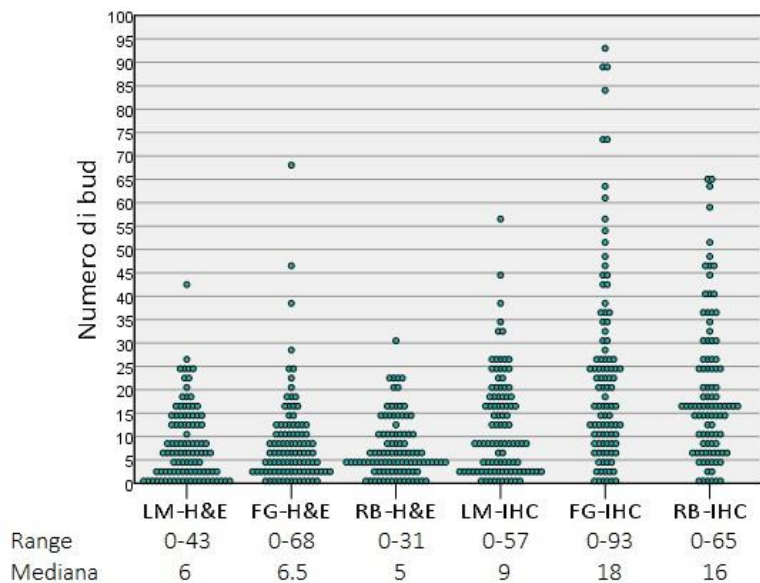
Al momento della resezione chirurgica l'età dei pazienti variava fra 44 e 93 anni (con un'età mediana di 74 anni e media di 72.4 anni). 52 pazienti erano di sesso femminile e 48 di sesso maschile. 50 tumori erano localizzati a livello del colon destro, e 50 nel colon sinistro, di cui 21 nel colon discendente, 5 nel sigma, 12 alla giunzione sigma-retto e 12 nel retto. Il numero mediano di linfonodi isolati è stato di 18 (range 3-88), con ≥ 12 linfonodi resecati nell'83% dei pazienti (numero medio di linfonodi metastatici 2,04 con range 0-31). 48 pazienti hanno ricevuto una terapia adiuvante. Durante il follow-up la recidiva di malattia è stata osservata in 25 pazienti, mentre 37 sono morti (con un tempo mediano dalla resezione al decesso di 33 mesi e un range 3.2-99.4 mesi): 17 a causa della recidiva di CCR, 4 per altre neoplasie maligne e 16 per altre malattie o cause ignote. Il tempo mediano di follow-up per i sopravvissuti è stato di 128,7 mesi (con range 13.7-166.2 mesi). Le principali caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 2.

5.2 RIPRODUCIBILITÀ DEL BUDDING CON LE DUE COLORAZIONI

La concordanza inter-osservatore nel conteggio dei bud con la colorazione immunohistochimica è stata superiore rispetto a quella con l'ematossilina-eosina (coefficiente di correlazione dei ranghi di Spearman, calcolato fra le coppie di osservatori LM-FG, FG-RB e LM-RB, con valori di $\rho=0.797$, 0.716 e 0.738 in ematossilina-eosina; $P<0.001$; in immunohistochimica, invece, i medesimi coefficienti sono

stati $\rho=0.840$, 0.719 e 0.768 ; $P<0.001$).

Figura 7:
Grafico di dispersione che mette a confronto il numero di bud contati, per ogni singolo caso, fra i tre osservatori con entrambe le colorazioni.



Il conteggio mediano dei bud è stato, per gli osservatori LM, FG e RB, rispettivamente di 6, 6.5 e 5 in ematossilina-eosina e di 9, 18 e 16 con l'immunoistochimica.

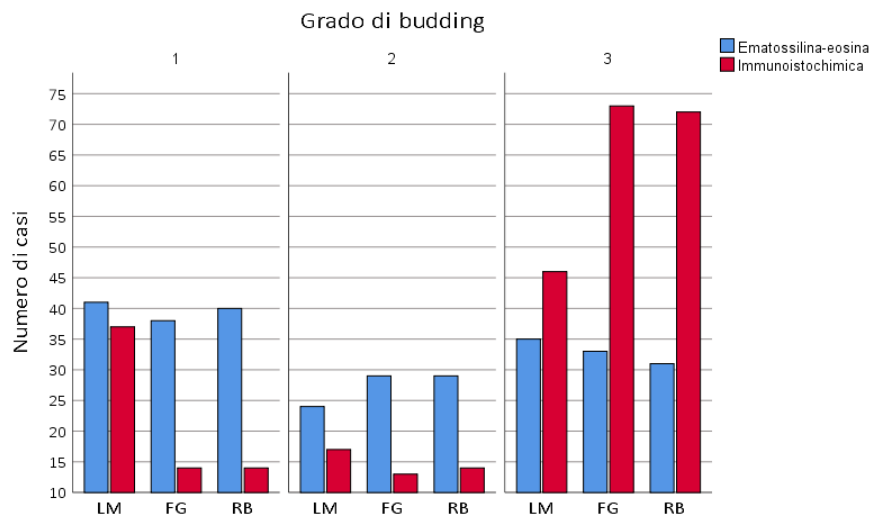


Figura 8: Istogramma che mostra il numero di volte che ciascun osservatore ha attribuito i diversi gradi di budding, con entrambe le colorazioni.

Tabella 3: Numero di volte che ciascun osservatore ha attribuito i diversi gradi di budding, con entrambe le colorazioni.

Osservatori	Grading in ematossilina-eosina			Grading in immunoistochimica		
	1	2	3	1	2	3
LM	41	24	35	37	17	46
FG	38	29	33	14	13	73
RB	40	29	31	14	14	72

La concordanza inter-osservatore nel grading del budding, tuttavia, è risultata superiore quando valutata con ematossilina-eosina ($\rho=0.750, 0.645$ e 0.666 ; $P<0.001$) rispetto alla valutazione immunoistochimica ($\rho=0.618, 0.605$ e 0.525 ; $P<0.001$).

La concordanza intra-osservatore, calcolata confrontando il grading attribuito in ematossilina-eosina ed in immunoistochimica per gli osservatori LM, FG e RB, è stata di $\rho=0.870, 0.584$ e 0.540 ($P<0.001$).

5.3 CONFRONTO FRA GRADING TRADIZIONALE E I NUOVI SISTEMI

Utilizzando le analisi univariate per ricercare un'associazione fra diversi predittori e le variabili di outcome “ricidiva di malattia” e “morte CCR-correlata”, questa è stata rilevata fra:

- Un grading tradizionale elevato e la comparsa di recidiva;
- Un elevato grado di budding in ematossilina-eosina e recidiva e morte legata alla malattia;
- Un elevato grado di budding in immunoistochimica e presenza di recidiva di malattia;
- Un elevato grado CIF, valutato con il metodo Arpa, e presenza di recidiva e morte CCR-correlata;
- Lo stadio (III vs II) è risultato associato a recidiva di malattia e morte per la stessa.

Non è stata rilevata nessuna associazione per un elevato grado di PDC e di grading combinato budding + PDC, quando valutato con i metodi secondo Lee e Backes.

Gli stessi predittori sono stati poi studiati attraverso analisi multivariate, costruendo diversi modelli basati sulla regressione logistica binaria in cui sono stati inseriti grading, stadio e una variabile tra le precedenti, come oggetto di studio. Sono stati definiti come outcome la recidiva e la morte. Solo il sistema di grading CIF è risultato un fattore prognostico indipendente rispetto alla ricorrenza di neoplasia. Anche lo stadio è risultato un fattore prognostico indipendente di recidiva, mantenendo la significatività statistica in tutti i modelli, mentre il grading tradizionale di malattia è risultato fattore prognostico indipendente di ricorrenza solo in un modello su 6. Nessun predittore è risultato un fattore prognostico indipendente rispetto alla morte secondaria al carcinoma colo-rettale, eccetto lo stadio in un modello su 6. I risultati delle analisi univariate e multivariate (condotte attraverso la regressione logistica) sono riportati nelle tabelle 4 e 5.

Tabella 4: Associazione fra parametri clinico-patologici e recidiva di malattia.

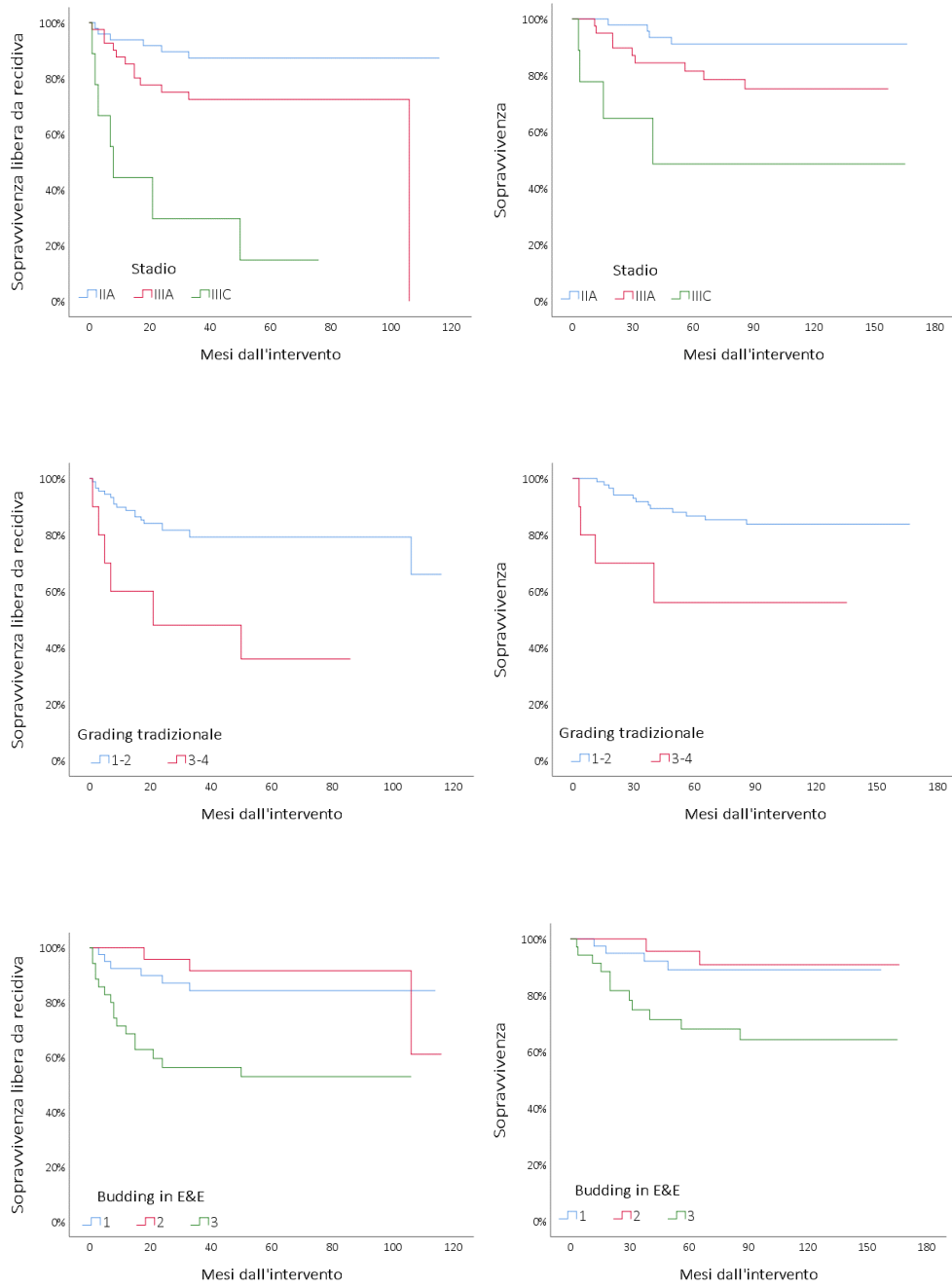
Predittore	Analisi univariate			Analisi multivariate		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Stadio	4.495	1.610- 12.545	0.003	3.379	1.152- 9.908	0.027
Grading tradizionale	5.605	1.435- 21.898	0.014	4.085	1.403- 11.892	0.010
Budding in E&E	5.240	1.990- 13.799	<0.00 1			
Budding in IIC	2.667	1.043- 6.815	0.037			
PDC						
Grading sec. Lee at al.						
Grading sec. Backes et al.						
Grading sec. Arpa et al.	4.571	1.751- 11.935	0.001	3.078	1.063- 8.915	0.038

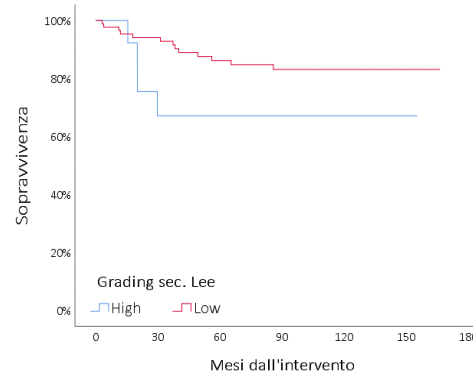
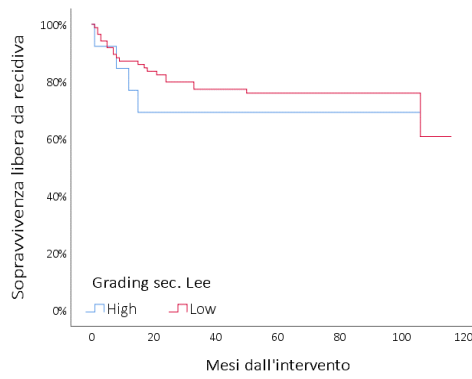
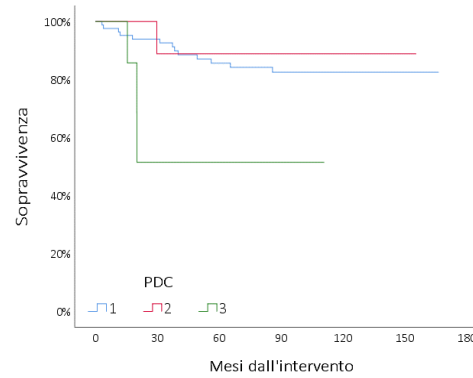
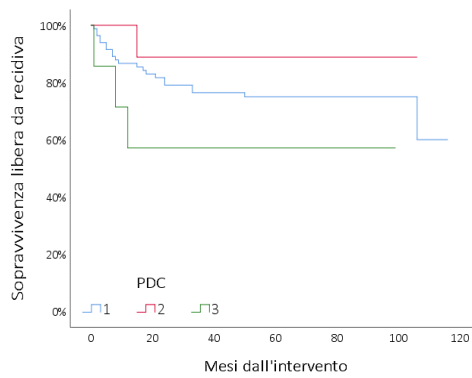
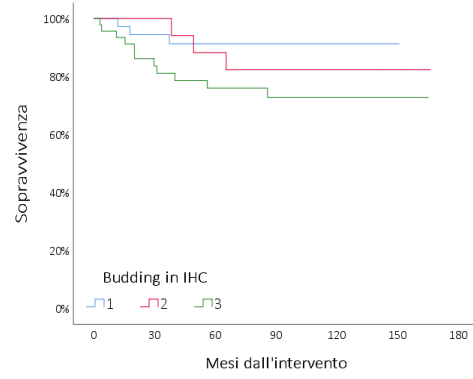
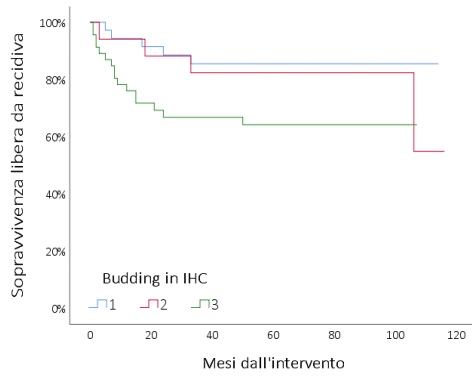
Tabella 5: Associazione fra parametri clinico-patologici e decesso.

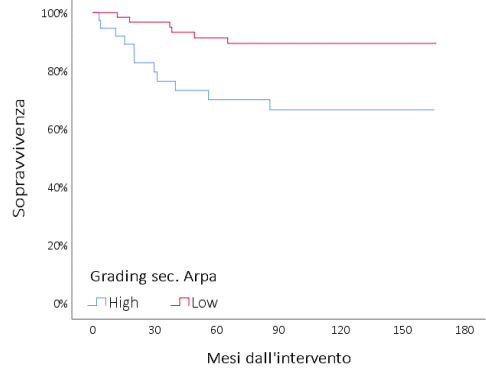
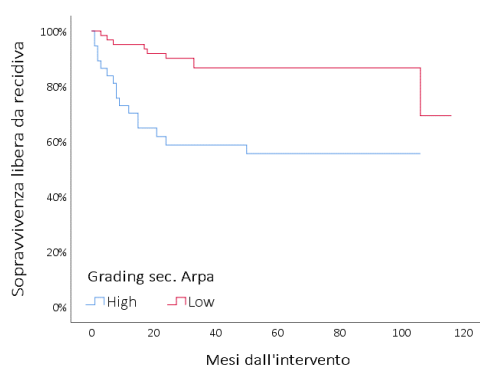
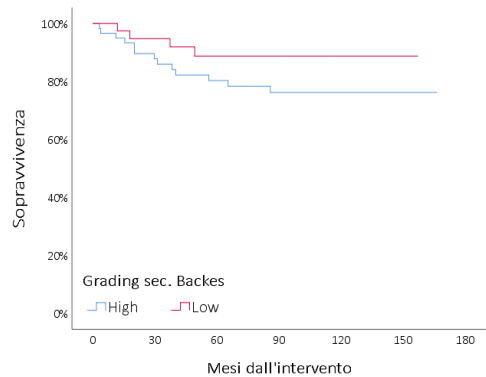
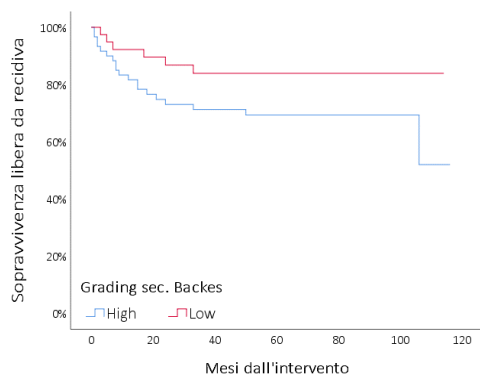
Predittore	Analisi univariate			Analisi multivariate		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Stadio	4.041	1.215- 13.433	0.017			
Grading tradizionale						
Budding in E&E	4.507	1.497- 13.568	0.005			
Budding in IIC						
PDC						
Grading sec. Lee at al.						
Grading sec. Backes et al.						
Grading sec. Arpa et al.	4.019	1.341- 12.045	0.009			

Per valutare l'influenza esercitata dai diversi predittori sugli outcome clinici è stato, inoltre, costruito un modello multivariato basato sulla regressione di Cox, in cui sono stati inseriti il grading di budding, PDC e i tre nuovi sistemi di grading, valutati in modelli separati, come variabili oggetto di studio e lo stadio di malattia come fattore confondente. Di questi modelli, solo quello contenente lo score CIF ha mostrato una significatività statistica (HR=1.659; 95% CI, 1.069-2.574; P=0.024) quando rapportato con la presenza di recidiva di malattia come variabile di outcome. Utilizzando, invece, come variabile dipendente la presenza di morte CCR-correlata, un'associazione significativa è stata identificata solo con il grading di PDC (HR=4.469; 95% CI, 1.140-17.513; P=0.032)

Figure 9-24: Curve di Kaplan-Meier che descrivono la relazione fra parametri clinico-patologici e gli outcome clinici (ricidiva di malattia e morte ad essa correlata).







6 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante il ruolo prognostico del budding nel CCR sia stato ampiamente validato nella letteratura e la ITBCC abbia posto le basi per un nuovo metodo di valutazione standardizzato e basato sull'evidenza, persistono alcune incertezze circa l'applicazione di questo fattore nella pratica clinico-patologica. L'utilizzo dell'immunoistochimica è uno degli aspetti irrisolti più dibattuti: laddove alcuni autori ne sconsigliano l'utilizzo routinario, limitandolo ai casi di più difficile valutazione per motivi di costo-efficacia,^{112,113} altri affermano che potrebbe migliorare la riproducibilità e l'accuratezza del conteggio, se utilizzata abitualmente.^{90,109,110}

L'obiettivo principale di questo studio è indagare la possibilità di implementare la colorazione immunoistochimica nell'abituale valutazione isto-patologica del budding nel carcinoma del colon-retto. A tal fine è stato scelto di analizzare la riproducibilità inter ed intra-osservatore con le due colorazioni, ematossilina-eosina e anticorpi anti-citocheratina CAM5.2, essendo la riproducibilità un parametro cruciale per definire un buon fattore prognostico morfologico. Questo studio ha evidenziato alcuni aspetti sull'utilizzo dell'immunoistochimica per la valutazione del budding.

Il primo è che l'utilizzo della colorazione CAM5.2 aumenta notevolmente il numero di bud contati rispetto alla tradizionale colorazione con ematossilina-eosina. Con quest'ultima i bud composti da una singola cellula risultano spesso di difficile identificazione, e la presenza di un denso infiltrato infiammatorio può ostacolarne la visualizzazione.

Il secondo è che con l'immunoistochimica si ottiene una maggiore concordanza fra i conteggi effettuati dai diversi osservatori rispetto alla colorazione con ematossilina-eosina. Pur restando la concordanza classificata come alta, i coefficienti di Spearman sono migliorati in tutte le tre coppie di osservatori valutate. L'incremento è stato maggiore nella coppia di patologi esperti rispetto alle altre due, nonostante un altro studio abbia identificato un miglioramento della riproducibilità più significativo in un gruppo di patologi non esperti.¹¹⁴

Il terzo è che la riproducibilità inter-osservatore calcolata con il grading attribuito dai tre osservatori è peggiorata con l'immunoistochimica rispetto alla colorazione tradizionale. Mentre con quest'ultima solo la coppia di patologi

esperti ha raggiunto una concordanza alta, tutti gli altri coefficienti indicano una concordanza moderata, con un peggioramento dei valori da ematossilina-eosina a immunohistochimica.

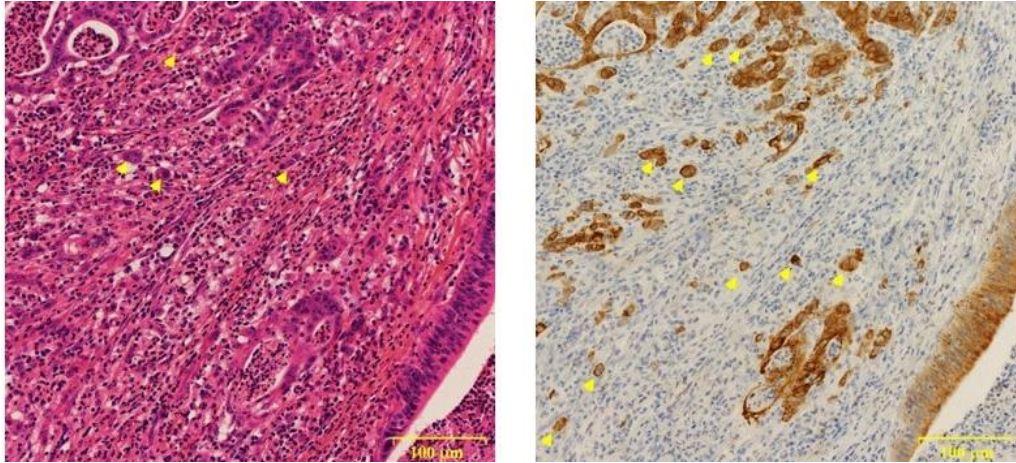


Figure 25 e 26: Immagini della medesima area del fronte invasivo, ad ingrandimento x20, colorate rispettivamente con ematossilina-eosina (E&E) e immunohistochimica (IIC). Le frecce indicano i bud. Diversi bud non visibili con l'E&E sono stati visualizzati con l'IIC, nell'area corrispondente della sezione seriata. Immagine tratta dall'articolo "Differential clinical impacts of tumour budding evaluated by the use of immunohistochemical and haematoxylin and eosin staining in stage II colorectal cancer", Yamadera et al. (2019).

L'ultimo aspetto evidenziato da questo studio è la variabilità della riproducibilità intra-osservatore con le due metodiche, che ha spaziato da un grado di concordanza elevato per un patologo esperto di patologia gastrointestinale, ad un grado moderato per gli altri due patologi.

La discrepanza fra i coefficienti di Spearman ottenuti nel conteggio e nel grading dei bud potrebbe riflettere la necessità di identificare un nuovo cut-off per il budding valutato in immunohistochimica. Sebbene nel conteggio sia stata identificata una maggiore concordanza inter-osservatore, l'utilizzo del cut-off normalmente dedicato all'ematossilina-eosina ha verosimilmente determinato una sovrastima del grading, inficiando sia la riproducibilità sia il valore prognostico determinati in immunohistochimica. Diversi studi e anche metanalisi suggeriscono, infatti, che il valore prognostico con le due colorazioni sia equivalente.^{89,90,110,115,116} Anche la riproducibilità intra-osservatore, moderata in 2 osservatori su 3, indica che l'elevazione del cut-off potrebbe migliorare l'effettiva concordanza nella refertazione. Diversi studi hanno tentato di definire

un nuovo cut-off per la colorazione anti-citocheratine, ottenendo sempre risultati differenti: 8, 15, 16, 17, 25.^{113,117-120} Si può notare che quasi tutti questi cut-off sono maggiori di 10, sebbene nessuno di questi studi abbia utilizzato il metodo dell'hotspot descritto da Lugli et al.⁸⁸

Una delle maggiori difficoltà legate al metodo raccomandato dalla ITBCC è la definizione dell'hotspot. L'utilizzo dell'immunoistochimica facilita l'identificazione dell'hotspot, in cui effettuare la valutazione, rispetto all'ematossilina-eosina. Un'altra ipotesi meritevole di ulteriori studi è la possibilità di definire l'hotspot su un vetrino colorato con anticorpi anticitocheratine, per poi effettuare il conteggio nella medesima area, su un vetrino colorato con la colorazione tradizionale. Questo potrebbe essere d'ausilio nel ridurre la variabilità inter-osservatore legata all'identificazione dell'hotspot. Il nostro risultato suggerisce che attraverso ulteriori studi, improntati ad un'ottimale definizione del cut-off, l'utilizzo dell'immunoistochimica potrebbe divenire di routine nella valutazione dei carcinomi del colon-retto. Con l'ematossilina-eosina, infatti, i bud composti da una singola cellula risultano spesso di difficile identificazione, ed in diversi scenari la valutazione con questa colorazione può rivelarsi insidiosa: la visualizzazione può essere ostacolata dalla presenza di un marcato infiltrato infiammatorio peritumorale oppure altri tipi cellulari, come cellule stromali reattive, possono essere interpretati come bud. L'obiettivo secondario di questo studio è valutare l'efficacia di alcuni nuovi sistemi di grading, che sostituiscono alla valutazione della percentuale di neoplasia interessata da strutture ghiandolari la valutazione del fronte invasivo della neoplasia, combinando il grading di budding e PDC. Abbiamo identificato tre metodi: quello descritto da Lee et al. nel 2018, in cui un alto grading corrisponde a Bd3 + PDC2, Bd2 + PDC3 e Bd3 + PDC3;⁹⁶ quello descritto da Backes et al. nel 2018, in cui viene classificato come alto grading quello che mostra almeno uno fra budding o PDC di grado 2-3;⁹⁵ il Combined Invasive Front (CIF) descritto da Arpa et al. nel 2019, in cui un alto grado corrisponde alla presenza di Bd3 o PDC3.⁹¹ Quest'ultima metodica è stata originariamente descritta nei carcinomi del piccolo intestino associati a malattia di Crohn; in

questo studio abbiamo, quindi, deciso di valutare se mantesse un valore prognostico anche nel carcinoma del colon-retto.

I nostri risultati identificano nel grading CIF un fattore prognostico indipendente di recidiva di malattia, con risultati sensibilmente migliori rispetto al grading tradizionale e agli altri sistemi di valutazione del fronte invasivo. Con una regressione logistica è risultato l'unico fattore statisticamente associato alla ricorrenza. Anche con un modello dei rischi proporzionali di Cox, il CIF è risultato l'unico fattore associato alla recidiva. Non è stata individuata un'associazione significativa con la morte per carcinoma del colon-retto.

Questi risultati suggeriscono che l'introduzione di un nuovo sistema di grading per il carcinoma del colon-retto potrebbe migliorare sensibilmente il valore prognostico rispetto al grading tradizionale. Già diversi studi hanno evidenziato la necessità di cambiare l'attuale sistema di grading, ritenuto penalizzato da un'eccessiva soggettività nella valutazione, dall'incerto valore prognostico e dall'inapplicabilità nei più rari sottotipi di adenocarcinoma (mucinoso, midollare, micropapillare, cribriforme, serrato ed a cellule ad anello con castone). In alcuni di questi studi,^{111,121,122} i Poorly Differentiated Clusters sono stati l'unico fattore preso in considerazione, mentre molto recente è l'idea, supportata da alcuni studi,^{91-94,96} che budding tumorale e PDC rappresentino distinte manifestazioni di un unico processo evolutivo, la transizione epiteliomesenchimale, responsabile dell'acquisizione di invasività da parte della neoplasia. Il nostro studio suggerisce che la valutazione del fronte invasivo, ed in particolare il grading Combined Invasive Front, sia un sistema più promettente di quello attualmente utilizzato, basato sulla percentuale di neoplasia con architettura ghiandolare. Nonostante ciò, sono necessari ulteriori studi per validarne il valore prognostico e la riproducibilità, affinché questa metodica possa sostituire quella tradizionale.

BIBLIOGRAFIA

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* (2018) doi:10.3322/caac.21492.
2. Rawla, P., Sunkara, T. & Barsouk, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz. Gastroenterol.* **14**, 89–103 (2019).
3. The Global Cancer Observatory. Cancer fact sheet. *World Heal. Organ.* (2019) doi:L11\n10.1051/0004-6361/201016331.
4. Center, M. M., Jemal, A., Smith, R. A. & Ward, E. Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA. Cancer J. Clin.* (2009) doi:10.3322/caac.20038.
5. Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J. & Forman, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study. *Lancet Oncol.* (2012) doi:10.1016/S1470-2045(12)70211-5.
6. Nguyen, T. T., Ung, T. T., Kim, N. H. & Jung, Y. Do. Role of bile acids in colon carcinogenesis. *World Journal of Clinical Cases* (2018) doi:10.12998/wjcc.v6.i13.577.
7. Santarelli, R. L., Pierre, F. & Corpet, D. E. Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr. Cancer* **60**, 131–144 (2008).
8. Bongaerts, B. W. C. *et al.* Alcohol consumption and distinct molecular pathways to colorectal cancer. *Br. J. Nutr.* **97**, 430–434 (2007).
9. Bardou, M., Barkun, A. N. & Martel, M. Obesity and colorectal cancer. *Gut* (2013) doi:10.1136/gutjnl-2013-304701.
10. Liang, P. S., Chen, T. Y. & Giovannucci, E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* (2009) doi:10.1002/ijc.24191.
11. Limsui, D. *et al.* Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *J. Natl. Cancer Inst.* (2010) doi:10.1093/jnci/djq201.
12. Abar, L. *et al.* Height and body fatness and colorectal cancer risk: an update of the WCRF–AICR systematic review of published prospective studies. *European Journal of Nutrition* (2018) doi:10.1007/s00394-017-1557-1.
13. Shaw, E. *et al.* Effects of physical activity on colorectal cancer risk among family history and body mass index subgroups: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* (2018) doi:10.1186/s12885-017-3970-5.
14. Kunzmann, A. T. *et al.* Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer and incident and recurrent adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* (2015) doi:10.3945/ajcn.115.113282.
15. Aune, D. *et al.* Dairy products and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Oncology* (2012) doi:10.1093/annonc/mdr269.
16. Conteduca, V., Sansonno, D., Russi, S. & Dammacco, F. Precancerous colorectal lesions (Review). *International Journal of Oncology* (2013) doi:10.3892/ijo.2013.2041.
17. Giovannucci, E. *et al.* Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N. Engl. J. Med.* (1995) doi:10.1056/NEJM199509073331001.
18. Rothwell, P. M. *et al.* Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and

mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* (2010)
doi:10.1016/S0140-6736(10)61543-7.

19. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* (2010) doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054.
20. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990) doi:10.1016/0092-8674(90)90186-I.
21. Nusse, R. *et al.* A new nomenclature for int-1 and related genes: The Wnt gene family. *Cell* (1991) doi:10.1016/0092-8674(91)90633-A.
22. Iwama, T. *et al.* Characteristics of Somatic Mutation of the Adenomatous Polyposis Coli Gene in Colorectal Tumors. *Cancer Res.* **54**, 3011–3020 (1994).
23. Mori, Y. *et al.* Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: Mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* (1992) doi:10.1093/hmg/1.4.229.
24. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* (1996) doi:10.1016/S0092-8674(00)81333-1.
25. Rubinfeld, B. *et al.* Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* (80-.). (1996) doi:10.1126/science.272.5264.1023.
26. He, T. C. *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* (80-.). (1998) doi:10.1126/science.281.5382.1509.
27. Tetsu, O. & McCormick, F. β -catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* (1999) doi:10.1038/18884.
28. Mann, B. *et al.* Target genes of β -catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1603–1608 (1999).
29. Crawford, H. C. *et al.* The metalloproteinase matrilysin is a target of β -catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* (1999) doi:10.1038/sj.onc.1202627.
30. Powell, S. M. *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* (1992) doi:10.1038/359235a0.
31. Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* (1998).
32. Samowitz, W. S. *et al.* β -catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res.* (1999).
33. Chung, D. C. The genetic basis of colorectal cancer: Insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* **119**, 854–865 (2000).
34. Fearon, E. R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* (2011).
35. Booth, R. A. Minimally invasive biomarkers for detection and staging of colorectal cancer. *Cancer Letters* (2007) doi:10.1016/j.canlet.2006.12.021.
36. Wei, Z. & Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* (2002) doi:10.1038/sj.cr.7290105.
37. McCain, J. The MAPK (ERK) pathway: Investigational combinations for the treatment of BRAF- mutated metastatic melanoma. *P T* **38**, (2013).
38. Duman-Scheel, M. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Pathfinding: Axon Guidance Gene Finally Turned Tumor Suppressor. *Curr. Drug Targets* (2012) doi:10.2174/138945012803530215.

39. Castets, M. *et al.* DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature* (2012) doi:10.1038/nature10708.
40. Worthley, D. L. & Leggett, B. A. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin. Biochem. Rev.* (2010).
41. Kanthan, R., Senger, J. L. & Kanthan, S. C. Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: A review. *Patholog. Res. Int.* (2012) doi:10.1155/2012/597497.
42. Pino, M. S. & Chung, D. C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* **138**, 2059–2072 (2010).
43. Markowitz, S. D. & Bertagnolli, M. M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* (2009) doi:10.1056/NEJMra0804588.
44. Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A. & Lahav, G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2019) doi:10.1038/s41580-019-0110-x.
45. Jiricny, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2006) doi:10.1038/nrm1907.
46. Nojadedh, J. N., Sharif, S. B. & Sakhinia, E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal* (2018) doi:10.17179/excli2017-948.
47. Herman, J. G. *et al.* Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998) doi:10.1073/pnas.95.12.6870.
48. Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology* (2010) doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064.
49. Iacopetta, B., Grieu, F. & Amanuel, B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **6**, 260–269 (2010).
50. De La Chapelle, A. & Hampel, H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* (2010) doi:10.1200/JCO.2009.27.0652.
51. Viguera, E., Canceill, D. & Ehrlich, S. D. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* (2001) doi:10.1093/emboj/20.10.2587.
52. Markowitz, S. *et al.* Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* (80-.). (1995) doi:10.1126/science.7761852.
53. Souza, R. F. *et al.* Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat. Genet.* (1996) doi:10.1038/ng1196-255.
54. Rampino, N. *et al.* Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* (80-.). (1997) doi:10.1126/science.275.5302.967.
55. Yoshitaka, T. *et al.* Mutations of E2F-4 Trinucleotide Repeats in Colorectal Cancer with Microsatellite Instability Colorectal tumorigenesis is one of the best characterized examples of the multi-step nature of the cancer . A dominant oncogene and tumor suppressor genes are co. **557**, 553–557 (1996).
56. Duval, A. *et al.* Frequent frameshift mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* (1999).
57. Schwartz, S. *et al.* Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite

- mutator phenotype. *Cancer Res.* (1999).
58. Wicking, C. *et al.* CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* (1998) doi:10.1038/sj.onc.1201971.
 59. Malkhosyan, S., Rampino, N., Yamamoto, H. & Perucho, M. Frameshift mutator mutations [1]. *Nature* (1996) doi:10.1038/382499a0.
 60. Boland, C. R. *et al.* A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. in *Cancer Research* (1998).
 61. Gryfe, R. *et al.* Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* (2000) doi:10.1056/NEJM200001133420201.
 62. Feinberg, A. P. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.* (2004) doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.005.
 63. De Vogel, S. *et al.* Genetic variants of methyl metabolizing enzymes and epigenetic regulators: Associations with promoter CpG island hypermethylation in colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2009) doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0289.
 64. Van Rijnsoever, M., Grieu, F., Elsaleh, H., Joseph, D. & Iacopetta, B. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* (2002) doi:10.1136/gut.51.6.797.
 65. Shen, L. *et al.* Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007) doi:10.1073/pnas.0704652104.
 66. Wu, C. & Bekaii-Saab, T. CpG Island Methylation, Microsatellite Instability, and BRAF Mutations and Their Clinical Application in the Treatment of Colon Cancer. *Chemother. Res. Pract.* **2012**, 1–10 (2012).
 67. Hughes, L. A. E. *et al.* The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: Progress and problems. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2012) doi:10.1016/j.bbcan.2011.10.005.
 68. Issa, J. P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer* (2004) doi:10.1038/nrc1507.
 69. Ang, P. W. *et al.* Comprehensive profiling of DNA methylation in colorectal cancer reveals subgroups with distinct clinicopathological and molecular features. *BMC Cancer* (2010) doi:10.1186/1471-2407-10-227.
 70. Weisenberger, D. J. *et al.* CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* (2006) doi:10.1038/ng1834.
 71. Ahuja, N. *et al.* Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* (1997).
 72. Hawkins, N. *et al.* CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* (2002) doi:10.1053/gast.2002.32997.
 73. Ward, R. L. *et al.* Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J. Clin. Oncol.* (2003) doi:10.1200/JCO.2003.03.123.

74. Shen, L. *et al.* Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* (2007) doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1011.
75. Barault, L. *et al.* Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: Study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res.* (2008) doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1171.
76. Jass, J. R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* (2007) doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x.
77. Pancione, M., Remo, A. & Colantuoni, V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog. Res. Int.* (2012) doi:10.1155/2012/509348.
78. Shih, I. M. *et al.* Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2001) doi:10.1073/pnas.051629398.
79. Feinberg, A. P., Ohlsson, R. & Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics* (2006) doi:10.1038/nrg1748.
80. Ohm, J. E. *et al.* A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat. Genet.* (2007) doi:10.1038/ng1972.
81. Irizarry, R. A. *et al.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* (2009) doi:10.1038/ng.298.
82. Young, J. *et al.* Serrated pathway colorectal cancer in the population: Genetic consideration. *Gut* (2007) doi:10.1136/gut.2007.126870.
83. Sawaguchi, K., Mai, M., Sugimura, T. & Esumi, H. Infrequent K-ras Activation in Superficial-Type (Flat) Colorectal Adenomas and Adenocarcinomas. *Cancer Res.* (1994).
84. Umetani, N. *et al.* Involvement of APC and K-ras mutation in non-polypoid colorectal tumorigenesis. *Br. J. Cancer* (2000) doi:10.1054/bjoc.1999.0869.
85. Aoki, T. *et al.* APC and p53 mutations in de novo colorectal adenocarcinomas. *Hum. Mutat.* (1994) doi:10.1002/humu.1380030403.
86. Yashiro, M. *et al.* Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res.* (2001).
87. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F. & Wang, H. L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology* (2012) doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030.
88. Lugli, A. *et al.* Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod. Pathol.* (2017) doi:10.1038/modpathol.2017.46.
89. van Wyk, H. C. *et al.* The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review. *Cancer Treatment Reviews* (2015) doi:10.1016/j.ctrv.2014.12.007.
90. Koelzer, V. H., Zlobec, I. & Lugli, A. Tumor budding in colorectal cancer - Ready for diagnostic practice? *Hum. Pathol.* (2016) doi:10.1016/j.humpath.2015.08.007.
91. Arpa, G. *et al.* Separation of Low- Versus High-grade Crohn's Disease-associated Small Bowel Carcinomas is Improved by Invasive Front Prognostic Marker Analysis.

J. Crohns. Colitis **14**, 295–302 (2020).

92. Reggiani Bonetti, L., Barresi, V., Bettelli, S., Domati, F. & Palmiere, C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: What is and ought to be known. *Diagnostic Pathology* (2016) doi:10.1186/s13000-016-0481-7.
93. Hong, M., Kim, J. W., Shin, M. K. & Kim, B. C. Poorly differentiated clusters in colorectal adenocarcinomas share biological similarities with micropapillary patterns as well as tumor buds. *J. Korean Med. Sci.* (2017) doi:10.3346/jkms.2017.32.10.1595.
94. Athanasakis, E., Xenaki, S., Venianaki, M., Chalkiadakis, G. & Chrysos, E. Newly recognized extratumoral features of colorectal cancer challenge the current tumor-node-metastasis staging system. *Annals of Gastroenterology* (2018) doi:10.20524/aog.2018.0284.
95. Backes, Y. *et al.* Histologic Factors Associated With Need for Surgery in Patients With Pedunculated T1 Colorectal Carcinomas. *Gastroenterology* (2018) doi:10.1053/j.gastro.2018.01.023.
96. Lee, V. W. K. & Chan, K. F. Tumor budding and poorly-differentiated cluster in prognostication in Stage II colon cancer. *Pathol. Res. Pract.* (2018) doi:10.1016/j.prp.2017.12.019.
97. Imai, T. The growth of human carcinoma: a morphological analysis. *Fukuoka Igaku Zasshi* (1954).
98. Gabbert, H., Wagner, R., Moll, R. & Gerharz, C. D. Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion. *Clin. Exp. Metastasis* **3**, 257–279 (1985).
99. Yokoyama, H. & Nagayo, T. Initial changes in the development of gastric cancer. *Gan No Rinsho* (1986).
100. Hayashida, K. *et al.* A studies of invasive colorectal carcinoma with reference mainly to vessel invasion and budding. *Nippon Daicho Komonbyo Gakkai Zasshi* vol. 40 119–126 (1987).
101. Morodomi, T. *et al.* 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* **63**, 539–543 (1989).
102. Hase, K., Shatney, C., Johnson, D., Trollope, M. & Vierra, M. Prognostic value of tumor ‘budding’ in patients with colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* **36**, 627–635 (1993).
103. Ueno, H., Murphy, J., Jass, J. R., Mochizuki, H. & Talbot, I. C. Tumour ‘budding’ as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* (2002) doi:10.1046/j.1365-2559.2002.01324.x.
104. Ueno, H. *et al.* Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* (2004) doi:10.1053/j.gastro.2004.04.022.
105. Nakamura, T., Mitomi, H., Kikuchi, S., Ohtani, 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).
106. 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) doi:10.1007/s10350-008-9192-9.
107. Wang, L. M. *et al.* Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* (2009) doi:10.1097/PAS.0b013e318184cd55.

108. Karamitopoulou, E. *et al.* Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* (2013) doi:10.1038/modpathol.2012.155.
109. Koelzer, V. H. *et al.* Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study. *Virchows Arch.* (2015) doi:10.1007/s00428-015-1740-9.
110. De Smedt, L., Palmans, S. & Sagaert, X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Archiv* (2016) doi:10.1007/s00428-015-1886-5.
111. Ueno, H. *et al.* New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* (2012) doi:10.1097/PAS.0b013e318235edee.
112. Graham, R. P. *et al.* Tumor budding in colorectal carcinoma: Confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am. J. Surg. Pathol.* (2015) doi:10.1097/PAS.0000000000000504.
113. Okamura, T. *et al.* Tumor Budding Detection by Immunohistochemical Staining is Not Superior to Hematoxylin and Eosin Staining for Predicting Lymph Node Metastasis in pT1 Colorectal Cancer. *Dis. Colon Rectum* **59**, 396–402 (2016).
114. Kai, K. *et al.* Cytokeratin immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer. *Pathol. Int.* (2016) doi:10.1111/pin.12374.
115. Mitrovic, B., Schaeffer, D. F., Riddell, R. H. & Kirsch, R. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Mod. Pathol.* (2012) doi:10.1038/modpathol.2012.94.
116. Rogers, A. C. *et al.* Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* (2016) doi:10.1038/bjc.2016.274.
117. Zlobec, I. *et al.* Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J. Gastroenterol.* (2010) doi:10.3748/wjg.v16.i38.4823.
118. Lugli, A. *et al.* CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: An independent prognostic factor representing a pro-/anti-tumour approach to tumour host interaction in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* (2009) doi:10.1038/sj.bjc.6605318.
119. Yamadera, M. *et al.* Differential clinical impacts of tumour budding evaluated by the use of immunohistochemical and haematoxylin and eosin staining in stage II colorectal cancer. *Histopathology* (2019) doi:10.1111/his.13830.
120. Prall, F., Nizze, H. & Barten, M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* **47**, 17–24 (2005).
121. Ueno, H. *et al.* Histological grading of colorectal cancer: A simple and objective method. *Ann. Surg.* (2008) doi:10.1097/SLA.0b013e318167580f.
122. Barresi, V., Bonetti, L. R., Leni, A., Caruso, R. A. & Tuccari, G. Histological grading in colorectal cancer: New insights and perspectives. *Histology and Histopathology* (2015) doi:10.14670/HH-11-633.