

Myofibroblasts and their relationship with oral squamous cell carcinoma

Miofibroblastos e sua relação com o carcinoma de células escamosas oral

Priscilla Suassuna Carneiro Lúcio¹, Alessandro Leite Cavalcanti², Pollianna Muniz Alves³,
Gustavo Pina Godoy², Cassiano Francisco Weege Nonaka²

Keywords:

carcinoma,
squamous cell;
immunohistochemistry;
myofibroblasts.

Abstract

Myofibroblasts are hybrid-phenotype differentiated cells in between fibroblasts and smooth muscle cells. Due to their contractile features and ability to synthesize extracellular matrix components, cytokines, proteases, and proangiogenic factors, myofibroblasts have been implicated in the pathogenesis of fibrocontractive diseases and in the progression of many tumors, including oral squamous cell carcinoma (SCC). **Objective:** To perform a literature review on the origin of myofibroblasts, their main morpho-physiological and immunohistochemical aspects, and to discuss the correlations with oral SCC. **Method:** A search was made on the PubMed database to select the main papers in the literature in English related to the subject, published between January 1991 and December 2011. **Conclusion:** Myofibroblasts are an important component of the stroma of oral SCCs, although they are not present in all tumors. Abundant presence of myofibroblasts may be associated with local disease recurrence and decreased patient survival. However, given the relatively limited number of studies on the subject, further research is needed to clarify the molecular mechanisms by which myofibroblasts influence the biological behavior of oral SCC.

Palavras-chave:

carcinoma de células
escamosas;
imunoistoquímica;
miofibroblastos.

Resumo

Os miofibroblastos são células especializadas que exibem um fenótipo híbrido, com características de fibroblastos e células musculares lisas. Devido sua habilidade contrátil e capacidade de síntese de componentes da matriz extracelular, citocinas, proteases e fatores pró-angiogênicos, os miofibroblastos têm sido implicados na patogênese de doenças fibrocontráteis e na progressão de diversos tumores, incluindo o carcinoma de células escamosas (CCE) oral. **Objetivo:** Fazer uma revisão da literatura sobre a origem dos miofibroblastos, seus principais aspectos morfofisiológicos e imuno-histoquímicos, assim como discutir sua relação com o CCE oral. **Método:** Realizou-se uma busca eletrônica na base de dados PubMed, selecionando os principais artigos da literatura em língua inglesa relacionados ao tema, publicados entre janeiro de 1991 e dezembro de 2011. **Conclusão:** Os miofibroblastos representam um componente importante do estroma de CCE orais, embora não estejam presentes em todos os casos desta neoplasia. A presença abundante destas células pode estar associada com a recorrência local da doença e diminuição da sobrevida dos pacientes. No entanto, em virtude do número relativamente limitado de estudos sobre o assunto, pesquisas ainda são necessárias para esclarecer os mecanismos moleculares pelos quais os miofibroblastos são capazes de influenciar no comportamento biológico do CCE oral.

¹ Mestranda (Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Estadual da Paraíba - UEPB - Campina Grande - PB - Brasil).

² Doutor (Professor - Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Estadual da Paraíba - UEPB - Campina Grande - PB - Brasil).

³ Doutora (Professora - Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Estadual da Paraíba - UEPB - Campina Grande - PB - Brasil).

Endereço para correspondência: Cassiano Francisco Weege Nonaka. Universidade Estadual da Paraíba Departamento de Odontologia Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Av. das Baraúnas, s/n. Bodocongó. Campina Grande - PB. Brasil. CEP: 58429-600.

Tel/Fax: +55 (83) 3315-3326. E-mail: cfwnonaka@gmail.com

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) do BJORL em 16 de março de 2012. cod. 9103.

Artigo aceito em 18 de junho de 2012.

INTRODUÇÃO

As neoplasias são compostas por células tumorais envoltas em um estroma constituído por vasos sanguíneos, fibroblastos, matriz extracelular (MEC), células inflamatórias e, ocasionalmente, miofibroblastos¹⁻⁴. Embora o estroma tenha sido considerado por muito tempo apenas como um tecido de suporte para as células neoplásicas, atualmente existem várias evidências que suportam o seu papel na promoção do fenótipo maligno^{2,4,5}. Alterações no estroma são frequentes em muitos tipos de neoplasias, incluindo o carcinoma de células escamosas (CCE) oral⁶.

Originalmente, propôs-se que os miofibroblastos seriam variantes dos fibroblastos, presentes em reações de granulação no processo de cicatrização de feridas, devido sua atividade contrátil. Hoje, os miofibroblastos são considerados células que exibem um fenótipo híbrido, com características de fibroblastos e células musculares lisas, capazes de expressar a isoforma α da actina de músculo liso (α -SMA) e estando caracterizados pela intensa síntese de proteínas da MEC, fatores de crescimento, como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de ceratinócitos (KGF), e proteases^{1,2,7,8}.

Estudos recentes têm demonstrado que o prognóstico desfavorável de alguns cânceres está correlacionado à presença de miofibroblastos no estroma neoplásico^{2,5,9}. Uma explicação admitida para tal evento está na capacidade dos produtos sintetizados por essas células em modular inúmeros eventos biológicos associados às características malignas, destacando-se, dentre esses, o crescimento, a diferenciação, a adesão, a migração e a invasão de células tumorais^{1,4,6,10,11}.

Além disso, pesquisas têm sugerido que os miofibroblastos podem constituir alvos potenciais para o tratamento de neoplasias malignas¹²⁻¹⁴. Dentre as principais vantagens para utilização destes tipos celulares como alvos na terapia antineoplásica, destacam-se a sua maior estabilidade genética e o possível desempenho de atividades e funções similares em tumores diversos¹⁴. Estratégias sugeridas para impedir a importante interação dos miofibroblastos com as células neoplásicas malignas incluem a inibição de vias de sinalização envolvidas no recrutamento e diferenciação dos miofibroblastos, além da erradicação direta destes tipos celulares^{12,13}.

Objetivo

Este trabalho tem o objetivo de fazer uma revisão da literatura sobre a origem dos miofibroblastos, seus principais aspectos morfofisiológicos e imuno-histoquímicos,

assim como discutir sua relação com o CCE oral, ampliando a compreensão sobre o assunto.

MÉTODO

Foi realizada a busca eletrônica de publicações na base de dados PubMed, utilizando-se as seguintes palavras-chave, obtidas de acordo com Medical Subject Headings (MeSH): *myofibroblasts*, *oral squamous cell carcinoma* e *immunohistochemistry*. Foram adotados como critérios de inclusão dos estudos: a) reportar-se aos miofibroblastos, tratar de seus aspectos morfofisiológicos, imuno-histoquímicos e/ou relacionar sua participação no desenvolvimento/progressão do CCE oral; b) ter sido desempenhado em modelo de estudo *in vivo* ou *in vitro*; c) ter sido divulgado no período de janeiro de 1991 a dezembro de 2011. A partir da análise da lista de referências, foram selecionados 43 trabalhos publicados de maior relevância sobre o tema.

REVISÃO DA LITERATURA

Origem

Inicialmente, acreditava-se que a substituição ou expansão dos miofibroblastos, durante a homeostase ou em processos patológicos, dava-se apenas a expensas de populações celulares residentes nos tecidos, com especial ênfase para os fibroblastos¹⁵⁻¹⁷. Entretanto, dependendo da natureza do tecido e de outras características do microambiente, diversos tipos celulares podem atuar como precursores para os miofibroblastos, como células musculares lisas, pericitos^{18,19}, células endoteliais¹⁵, células estreladas do pâncreas e do fígado^{4,15}, adipócitos e células mioepiteliais⁴. Estudos têm demonstrado, ainda, outras fontes potenciais para os miofibroblastos, incluindo as células-tronco mesenquimais residentes nos tecidos, os fibrócitos derivados da medula óssea e a transição epitélio-mesenquimal^{15-17,19,20}.

A diferenciação de fibroblastos residentes em miofibroblastos é induzida por sinais parácrinos, gerados pela reparação ou tecidos inflamados. Membros da família do fator de crescimento transformante β (TGF- β), PDGF, fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) e interleucina-4 (IL-4) parecem ser os principais fatores envolvidos no processo de diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos^{1,2,12}. Destaque especial é dado ao TGF- β 1, um peptídeo multifuncional que regula várias atividades celulares, incluindo crescimento e diferenciação celular, expressão e metabolismo de macromoléculas da MEC^{21,22}. Ele induz os fibroblastos a sintetizarem a fibronectina, a qual estimula a síntese de α -SMA, que, por sua vez, é incorporada às fibras de estresse. Em seguida, novas proteínas são sintetizadas,

permitindo adesões moleculares entre os miofilamentos de α -SMA, a membrana citoplasmática e fibronectina, caracterizando os miofibroblastos completamente diferenciados^{8,20}.

Aspectos morfofisiológicos e imuno-histoquímicos

Os miofibroblastos são células que, fisiologicamente, secretam altos níveis de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, hormônios, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão e da MEC^{2,7}. Estes tipos celulares estão presentes em pequenas quantidades na maioria dos órgãos, em especial naqueles locais cuja força mecânica é necessária: cavidade oral, pele, trato gastrointestinal, útero, testículo, coração^{20,21}.

Morfológicamente, os miofibroblastos se apresentam como células alongadas ou estreladas, de citoplasma palidamente eosinofílico, exibindo núcleo regular e central, com discretas indentações e pequenos nucléolos¹². Ultraestruturalmente, os miofibroblastos estão caracterizados pela presença de um aparato contrátil, organizado sob a forma de feixes de miofilamentos periféricos de α -SMA, os quais são análogos às fibras de estresse evidenciadas em fibroblastos cultivados *in vitro*. Estes miofilamentos estão conectados aos complexos de adesão especializados, os quais se localizam na superfície celular, denominados fibronexos^{16,17,20}. Nestas estruturas, os miofilamentos ligam-se às integrinas, as quais, por sua vez, conectam-se à fibronectina existente na MEC. Funcionalmente, este aparato contrátil provê um sistema mecanotransdutor, capaz de transmitir a força gerada pelas fibras de estresse à MEC^{17,23,24}.

Analogamente aos fibroblastos ativos, tais células possuem um retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, resultado da intensa síntese e secreção de proteínas, com destaque para o colágeno^{17,20}. De modo semelhante às células musculares lisas, a presença de junções do tipo *gap* permite a aderência e comunicação eletroquímica entre os miofibroblastos. Porém de forma contrária, eles são desprovidos de lâmina externa^{12,17,20,23}.

A α -SMA tem sido descrita como o marcador mais importante para identificar miofibroblastos diferenciados^{4,15}, embora não permita a distinção entre estes elementos celulares e as células musculares lisas^{15,17}. Usualmente, os miofibroblastos são negativos para antígenos presentes em células musculares lisas, como as cadeias pesadas de miosina de músculo liso, caldesmon e desmina^{16,18,20}. Porém, estudos demonstraram que os miofibroblastos, especialmente em estágios mais avançados de diferenciação, podem expressar antígenos observados em células musculares lisas^{23,25}, revelando que o padrão de expressão destas proteínas nestes

tipos celulares pode variar dependendo da localização e da natureza do processo patológico. Tipicamente, os miofibroblastos são negativos para citoqueratinas (marcadores de células epiteliais), CD68 (marcador de monócitos/macrófagos), CD31 (marcador de células endoteliais) e CD34^{4,12,26}.

Até a década de 90, a *smoothelin*, uma proteína associada ao aparato contrátil, era considerada um marcador de diferenciação tardia de células musculares lisas, cuja expressão não era observada em miofibroblastos^{27,28}. Posteriormente, foi verificado que fibroblastos pulmonares tratados com TGF- β 1 eram capazes de expressar *smoothelin*²⁹. Mais recentemente, a isoforma 4Ig da proteína paladina das fibras de estresse foi proposta como um novo marcador de diferenciação miofibroblástica³⁰. Entretanto, um estudo *western blotting* prévio, utilizando anticorpos contra diversas formas de proteínas paladinas, indicou expressão desta isoforma em células musculares lisas³¹. Conforme Hinz et al.¹⁵, até o momento, não foi identificada uma proteína de citoesqueleto capaz de, isoladamente, diferenciar miofibroblastos de células musculares lisas.

Miofibroblastos e o carcinoma de células escamosas oral

Os miofibroblastos têm sido identificados como um componente importante do estroma de diversos tumores sólidos malignos, como carcinomas de mama, carcinomas hepatocelulares e melanomas^{2,4,11}. No entanto, pesquisas sobre a presença dos miofibroblastos em CCE oral e investigações sobre a possível influência destes tipos celulares no comportamento biológico desta neoplasia e os mecanismos moleculares envolvidos neste processo são escassas e foram publicadas, em grande parte, apenas nos últimos cinco anos^{3,5,13,32-36}.

Lewis et al.⁶, em estudo *in vitro* com linhagens celulares de CCE oral e fibroblastos orais primários normais, verificaram que as células neoplásicas, através da secreção de TGF- β 1, são capazes de induzir a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. Os autores observaram, também, que os miofibroblastos secretavam maiores quantidades do HGF em comparação com os fibroblastos primários e que esta citocina, por sua vez, era capaz de promover a invasão das células de CCE oral através do matrigel. De acordo com os autores, tais achados sugerem a existência de um mecanismo parácrino duplo entre células do CCE oral e miofibroblastos.

Kellermann et al.⁸, utilizando um modelo experimental semelhante ao empregado no trabalho de Lewis et al.⁶, corroboraram a atuação importante das células do CCE oral no processo de diferenciação dos fibroblastos orais primários normais em miofibroblastos, através da

secreção de TGF- β 1. Além disso, os autores observaram que o tratamento das linhagens celulares de CCE oral com meio condicionado por miofibroblastos determinou aumento significativo nos índices de proliferação das células tumorais. De acordo com Kellermann et al.⁸, os resultados obtidos em seu estudo demonstram a existência de efeitos parácrinos mútuos entre células do CCE oral e fibroblastos orais normais, caracterizados pela indução da transdiferenciação destes últimos tipos celulares em miofibroblastos e pela modulação da proliferação das células neoplásicas malignas.

Estudos em modelos animais também demonstram evidências que sugerem um importante papel para as células epiteliais malignas no surgimento dos miofibroblastos em carcinomas orais. Vered et al.³⁷, em estudo de carcinogênese experimental com óxido de nitroquinolina (4NQO) na mucosa da língua de ratos Wistar, observaram que, em áreas de epitélio normal, hiperkeratótico/hiperplásico e displásico, os miofibroblastos eram escassos ou completamente ausentes no tecido conjuntivo subjacente. Contudo, nas áreas de carcinoma superficial ou invasivo, foi constatado aumento significativo no número de miofibroblastos, por vezes com íntima proximidade entre estes tipos celulares e as células neoplásicas malignas. Para os autores, estes achados sugerem a ocorrência de importantes interações epitélio-mesênquima simultaneamente à transformação maligna ou uma possível transdiferenciação das células epiteliais malignas em miofibroblastos durante a carcinogênese oral.

Em adição aos achados reportados anteriormente, Vered et al.³⁵ observaram, novamente em estudo de carcinogênese experimental com 4NQO na mucosa da língua de ratos, que carcinomas orais de animais dessalivados apresentavam número significativamente menor de miofibroblastos em comparação aos carcinomas de animais sem alterações no fluxo salivar. De acordo com os autores, a presença de um número significativo de miofibroblastos no CCE oral parece depender não apenas de fatores secretados pelas células neoplásicas epiteliais malignas, mas também da participação de mediadores químicos presentes na saliva, com destaque para o TGF- β .

Kellermann et al.³ avaliaram, por imuno-histoquímica, a presença de miofibroblastos em CCE de língua, displasias epiteliais orais e espécimes de mucosa oral normal. Em detrimento aos espécimes de mucosa oral normal e de displasia epitelial oral, os miofibroblastos foram observados apenas no estroma dos carcinomas, particularmente no *front* de invasão tumoral. Além disso, foram constatadas menores taxas de sobrevida geral nos pacientes cujos tumores possuíam uma abundante quan-

tidade de miofibroblastos no *front* de invasão tumoral. Resultados similares foram obtidos no estudo realizado por Kawashiri et al.³³ em CCE de diversas regiões anatômicas da cavidade oral. Para Kellermann et al.³, a análise da quantidade de miofibroblastos nos CCEs de língua poderia ser útil na determinação do prognóstico para os pacientes portadores destes tumores.

Vered et al.³⁵ realizaram análise imuno-histoquímica da presença de miofibroblastos em CCE de língua e verificaram maior frequência de tumores com alto escore de miofibroblastos em pacientes com menos de 60 anos. Foi observado, também, que pacientes cujos tumores exibiam maiores quantidades de miofibroblastos possuíam menor percentual de sobrevida livre de doença em cinco anos (37,6% vs. 82,3%). Além disso, o percentual de pacientes vivos cinco anos após o diagnóstico da lesão foi significativamente menor no grupo dos tumores com alto escore de miofibroblastos (61,2%) em comparação com o grupo dos tumores com baixo escore destas células (90,6%). Após análise de regressão multivariada, a abundância de miofibroblastos no estroma tumoral demonstrou efeito adverso independente sobre a recorrência local. Para Vered et al.³⁵, uma abundante quantidade de miofibroblastos no estroma do CCE de língua causaria um impacto desfavorável no risco de recorrência local destes tumores, especialmente em pacientes com menos de 60 anos.

DISCUSSÃO

Embora considerado por muito tempo apenas como um tecido de suporte para as células neoplásicas, resultados obtidos em numerosas investigações científicas suportam a hipótese de que o estroma é capaz de regular os processos de invasão e metástase tumoral^{2,4,5}. A despeito da diversidade de tipos celulares existentes no estroma tumoral, como células endoteliais sanguíneas e linfáticas, células inflamatórias e células do sistema imune, estudos têm apontado os miofibroblastos como um dos principais tipos celulares envolvidos na promoção do fenótipo maligno^{1-5,10}.

Apesar de pouco numerosas, as pesquisas realizadas em CCE oral sugerem um importante papel para os miofibroblastos no processo de invasão desta neoplasia maligna e associam a presença destes tipos celulares com a recorrência local da doença e com diminuição da sobrevida dos pacientes^{3,5,6,33-36}. Os mecanismos moleculares pelos quais os miofibroblastos influenciam no comportamento biológico do CCE oral ainda não são completamente compreendidos, mas podem envolver a modulação da expressão de diversos fatores de crescimento, citocinas, componentes da MEC e enzimas

proteolíticas, com destaque para as metaloproteinases de matriz (MMPs), como observado em estudos realizados com outras neoplasias malignas^{1,5,8}.

Em virtude de sua capacidade de síntese e secreção de vários fatores de crescimento, como HGF, PDGF, KGF e fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF)^{1,2,38}, pesquisas têm sugerido uma participação importante dos miofibroblastos no estímulo à proliferação de células neoplásicas^{10,39}. A despeito da assertiva anterior, Lewis et al.⁶ observaram que células de CCE oral cultivadas em meio condicionado por fibroblastos apresentavam índices de proliferação celular semelhantes aos das cultivadas em meio condicionado por miofibroblastos. Por outro lado, Kellermann et al.⁸ observaram aumento significativo nos índices de proliferação celular nas linhagens de CCE oral cultivadas em meio condicionado por miofibroblastos. Este efeito indutor dos miofibroblastos sobre a proliferação celular no CCE oral foi corroborado posteriormente por Sobral et al.⁵. Além disso, estes autores identificaram que os efeitos dos miofibroblastos sobre a proliferação celular no CCE oral são decorrentes da secreção de activina-A, uma proteína pertencente à família do TGF- β .

Pesquisas têm revelado que os miofibroblastos podem favorecer a migração das células neoplásicas^{17,40}, provavelmente por meio da secreção de proteases capazes de degradar componentes da MEC, como as MMPs -2, -3 e -9^{4,41}, a uroquinase ativadora do plasminogênio^{2,39} e a proteína ativadora de fibroblastos⁴⁰. Em consonância com estes achados, Sobral et al.⁵ constataram, em estudo *in vitro*, que os miofibroblastos foram capazes de induzir a invasão das células de CCE oral através do matrigel, um evento acompanhado por aumento na síntese de metaloproteinases nas células tumorais, particularmente as MMPs-1, -2, -9 e -13. Além disso, esses autores observaram, *in vivo*, correlação significativa entre a presença de miofibroblastos e atividade enzimática das MMPs-2 e -9 em amostras de CCE oral, por análise zimográfica. Outros estudos em CCE oral revelam, ainda, que os miofibroblastos são capazes de estimular o processo de invasão tumoral pela secreção de quimiocinas⁴² e da síntese de componentes específicos da MEC, como algumas isoformas de laminina⁴³.

Apesar dos diversos mecanismos apresentados anteriormente e das pesquisas que sugerem um importante papel para os miofibroblastos no processo de invasão do CCE oral e associam a presença destes tipos celulares com a recorrência local da doença e com diminuição da sobrevida dos pacientes^{3,5,6,33-36}, estudos imuno-histoquímicos revelam percentuais importantes de CCE orais que apresentam escassa quantidade de

miofibroblastos ou são considerados negativos para estes tipos celulares.

No trabalho realizado por Kellermann et al.⁸, 39,48% (n = 15) dos CCE orais foram classificados como negativos para miofibroblastos em seus estromas. Além disso, 11 (47,82%) dos 23 casos de CCE oral considerados positivos para miofibroblastos revelaram escassa quantidade destes tipos celulares. Apesar disto, estes autores observaram correlação significativa entre abundante quantidade de miofibroblastos no estroma tumoral e envolvimento linfonodal regional, estadiamento clínico avançado e recorrência regional (em linfonodos). Em outro estudo, De-Assis et al.⁹ relataram uma quantidade abundante de miofibroblastos em 15 (36,58%) de 41 casos de CCE oral avaliados imuno-histoquimicamente, a maioria dos quais apresentava alto grau histológico de malignidade⁹. Em conjunto, os achados destes estudos revelam que os miofibroblastos não são um constituinte comum a todos os CCE orais e, adicionalmente, sugerem que a análise da quantidade destas células estromais pode auxiliar na identificação de lesões com comportamento biológico mais agressivo.

Além de não estarem presentes de forma abundante em todos os CCE orais, diversos trabalhos têm sugerido o envolvimento dos miofibroblastos apenas em estágios mais avançados da carcinogênese oral. Assim, usualmente, lesões leucoplásicas com graus variados de displasia epitelial não revelam miofibroblastos na lâmina própria, estando o aparecimento de quantidades significativas destes tipos celulares intimamente associado à presença de invasão do tecido conjuntivo subjacente^{3,9,13}. De acordo com Etemad-Moghadam et al.¹³, o aparecimento dos miofibroblastos nos CCE orais poderia estar relacionado a um efeito indutor do epitélio carcinomatoso sobre o estroma circunvizinho.

CONCLUSÃO

Os miofibroblastos representam um componente importante do estroma de CCE orais, embora não estejam presentes em todos os casos desta neoplasia. Apesar de escassos, resultados de estudos *in vitro* sugerem o envolvimento destas células com capacidade contrátil no processo de invasão dos CCE orais, provavelmente em decorrência da modulação da expressão de fatores de crescimento, citocinas, componentes da MEC e enzimas proteolíticas. Além disso, investigações clínico-patológicas e imuno-histoquímicas associam a presença de um número abundante de miofibroblastos no estroma dos CCE orais com a recorrência local da doença e com diminuição da sobrevida dos pacientes. Apesar destes importantes achados, em virtude do

número relativamente limitado de estudos sobre o assunto, pesquisas ainda são necessárias para esclarecer os mecanismos moleculares pelos quais os miofibroblastos são capazes de influenciar no comportamento biológico do CCE oral.

REFERÊNCIAS

1. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*. 1999;277(1 Pt 1):C1-19.
2. Desmoulière A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):509-17.
3. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology*. 2007;51(6):849-53.
4. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008;123(10):2229-38.
5. Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol*. 2011;47(9):840-6.
6. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, et al. Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2004;90(4):822-32.
7. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006;5(15):1597-601.
8. Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol*. 2008;44(5):509-17.
9. de-Assis EM, Pimenta LG, Costa-E-Silva E, Souza PE, Horta MC. Stromal myofibroblasts in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(5):e733-8.
10. Bagloli CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, et al. More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunol Invest*. 2006;35(3-4):297-325.
11. Orimo A, Gupta P, Sgroi D, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.
12. Mücke P, Ostman A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*. 2004;45 Suppl 2:163-75.
13. Etemad-Moghadam S, Khalili M, Tirgary F, Alaeddini M. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(8):639-43.
14. Thode C, Jørgensen TG, Dabelsteen E, Mackenzie I, Dabelsteen S. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(3):201-7.
15. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170(6):1807-16.
16. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function, and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):666-71.
17. Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P, Fisher C. The myofibroblast and its tumors. *J Clin Pathol*. 2009;62(3):236-49.
18. Schurch W, Seemayer TA, Hinz B, Gabbiani G. Myofibroblast. In: Mills SE, ed. *Histology for pathologists*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott; 2007. p.123-64.
19. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech*. 2010;43(1):146-55.
20. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med*. 2008;12(1):22-37.
21. Huang X, Lee C. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF- β . *Front Biosci*. 2003;8:s740-9.
22. Franz M, Spiegel K, Umbreit C, Richter P, Codina-Canet C, Berndt A, et al. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol*. 2009;131(5):651-60.
23. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349-63.
24. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003;200(4):500-3.
25. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res*. 1999;250(2):273-83.
26. Salgueiredo-Giudice F, Fornias-Sperandio F, Martins-Pereira E, da Costa dal Vecchio AM, de Sousa SC, dos Santos-Pinto-Junior D. The immunohistochemical profile of oral inflammatory myofibroblastic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(6):749-56.
27. Van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, Van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 1996;134(2):401-11.
28. Van der Loop FT, Gabbiani G, Kohonen G, Ramaekers FC, Van Eys GJ. Differentiation of smooth muscle cells in human blood vessels as defined by smoothelin, a novel marker for the contractile phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(4):665-71.
29. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor- β 1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol*. 2003;162(2):533-46.
30. Rönty MJ, Leivonen SK, Hinz B, Rachlin A, Otey CA, Kähäri VM, et al. Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein palladin during TGF- β 1-induced myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol*. 2006;126(11):2387-96.
31. Mykkänen OM, Grönholm M, Rönty M, Lalowsky M, Salmikangas P, Suila H, et al. Characterization of human palladin, a microfilament-associated protein. *Mol Biol Cell*. 2001;12(10):3060-73.
32. Nielsen JD, Moeslund M, Wandall HH, Dabelsteen S. Influences of the tumor stroma on the malignant phenotype. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(7):412-6.
33. Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2009;31(10):1346-53.
34. Seifi S, Shafaei S, Shafiq E, Sahabi SM, Ghasemi H. Myofibroblast stromal presence and distribution in squamous epithelial carcinomas, oral dysplasia and hyperkeratosis. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2010;11(2):359-64.
35. Vered M, Dobriyan A, Dayan D, Yahalom R, Talmi YP, Bedrin L, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci*. 2010;101(1):274-80.
36. Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, Vallath S, Hopper C, Jerjes W, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol*. 2011;223(4):470-81.

-
37. Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts and malignant transformation in a 4QNO rat tongue carcinogenesis model. *Oral Oncol.* 2007;43(10):999-1006.
38. Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem.* 1994;269(14):10753-7.
39. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004;432(7015):332-7.
40. Chen H, Yang WW, Wen QT, Xu L, Chen M. TGF-beta induces fibroblast activation protein expression; fibroblast activation protein expression increases the proliferation, adhesion, and migration of HO-8910PM. *Exp Mol Pathol.* 2009;87(3):189-94.
41. Novo E, di Bonzo LV, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(11):2089-93.
42. Daly AJ, McIlreavey L, Irwin CR. Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts-implications for invasion of oral cancer. *Oral Oncol.* 2008;44(7):646-51.
43. Franz M, Wolheim A, Richter P, Umbreit C, Dahse R, Driemel O, et al. Stromal laminin chain distribution in normal, hyperplastic and malignant oral mucosa: relation to myofibroblast occurrence and vessel formation. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(4):290-8.