

UNIVERSIDADE DE UBERABA

ANAÍSE NETO OLIVEIRA

TACIANA ANDRADE SANGIOVANI FERREIRA

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES NO
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

UBERABA-MG

2017

ANAÍSE NETO OLIVEIRA
TACIANA ANDRADE SANGIOVANI FERREIRA

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES NO
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade de Uberaba como parte da conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Odontologia do segundo semestre de 2017.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo

UBERABA-MG

2017

O4e Oliveira, Anaíse Neto.
Estudo da utilização de biomarcadores salivares no diagnóstico e prognóstico do câncer oral / Anaíse Neto Oliveira, Taciana Andrade Sangiovani Ferreira. – Uberaba, 2017.
18 f.

Trabalho de Conclusão de Curso -- Universidade de Uberaba.
Curso de Odontologia, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo.

1. Boca – Câncer – Tratamento. 2. Odontologia. 3. Diagnóstico. 4. Biomarcadores. I. Ferreira, Taciana Andrade Sangiovani. II. Araújo, Marcelo Sivieri de. III. Universidade de Uberaba. Curso de Odontologia. IV. Título.

CDD 616.99431

Ficha elaborada pela bibliotecária Tatiane da Silva Viana CRB6-3171

ANAÍSE NETO OLIVEIRA

TACIANA ANDRADE SANGIOVANI FERREIRA

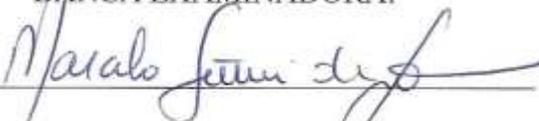
**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES NO
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Universidade de Uberaba como parte da
conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão
de Curso II do curso de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo.

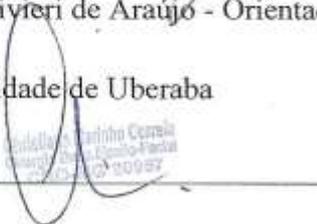
Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcelo Sivieri de Araújo - Orientador

Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Christiano Marinho Correia

Universidade de Uberaba

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES SALIVARES NO
DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DO CÂNCER ORAL**

**STUDY OF THE USE OF SALIVARY BIOMARKERS NON-DIAGNOSIS AND
PROGNOSIS OF ORAL CANCER**

Anaíse Neto OLIVEIRA¹

Taciana Andrade Sangiovani FERREIRA¹

Marcelo Sivieri de ARAÚJO²

1- Acadêmicas do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba.

2- Professor do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Odontologia – Universidade de Uberaba.

Endereço para correspondência:

Rua Adelardo Nascimento, 612 Bairro Universitário

Uberaba – MG CEP:38050540

E-mail: anaise-neto@hotmail.com

Resumo:

Os biomarcadores são moléculas biológicas encontradas no sangue, em fluidos corporais e tecidos, que servem como indicadores de um processo normal ou anormal, ou de uma condição de doença. O uso de biomarcadores salivares como ferramenta no diagnóstico do carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é confiável, devido ao seu contato direto com as lesões presentes na boca. A coleta da saliva caracteriza-se por ser um meio de fácil acesso, trazendo conforto ao paciente, além de fácil armazenamento e baixo custo. O diagnóstico

CCEO geralmente é dado com base nas mudanças de concentração dos solutos presentes na saliva, que podem ser usadas para o detectar o câncer em estágio inicial ou monitorar a resposta ao tratamento terapêutico. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura no período de 2007 a 2017 sobre os achados científicos que descrevem a utilização de biomarcadores salivares no diagnóstico e prognóstico do câncer oral, as principais proteínas alteradas na análise dos solutos e a importância do diagnóstico precoce para o CCEO. Os biomarcadores são usados na avaliação do paciente, estimando o risco da doença e buscando neoplasias ocultas, visando ainda, diminuir a frequência da doença, sintomas e o tamanho das lesões, pois, estas podem ser detectadas precocemente.

Palavras-chave: Biomarcadores. Biomarcadores salivares. Câncer oral. Diagnóstico. Tratamento.

Abstract:

Biomarkers are biological molecules found in blood, body fluids and tissues, which serve as indicators of a normal or abnormal process, or a disease condition. The use of salivary biomarkers as a diagnostic tool for oral squamous cell carcinoma (CCEO) is reliable because of their direct contact with them as present in the mouth. The collection of saliva is characterized by being a medium of easy access, bringing comfort to the patient, besides easy storage and low cost. The diagnosis of CCEO is usually given based on changes in product concentration, as you can be used to detect early-stage cancer or monitor the response to therapeutic treatment. The objective of this work is to carry out a literature review without period from 2007 to 2017 on the scientific findings describing a use of salivary biomarkers diagnostic and oral cancer prognoses, as the main altered proteins in the analysis of the solutes and importance of the previous diagnosis for the CCEO. The biomarkers are in the evaluation of the patient, estimating the risk of the disease and seeking occult neoplasias,

aiming also to decrease the frequency of the disease, the symptoms and the size of the lesions, as these can be detected early.

Keys-words: Biomarkers. Salivary biomarkers. Oral cancer. Diagnosis. Treatment.

Introdução:

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO), é um tipo de neoplasia maligna que tem sua origem no epitélio de revestimento. Seus índices de mortalidade, variam de acordo com as localidades no país e entre os países. Essas variações ocorrem devido as expectativas de vida, características socioeconômicas, diferenças de hábitos, fatores ambientais, raça, educação preventiva, qualidade de assistência médica e odontológica nas regiões.

A abordagem do CCEO torna-se complexa, pois, muitas vezes, enfrenta-se o atraso na detecção e a falta de recursos imediatos dos profissionais de saúde, além de envolver o medo e o preconceito dos pacientes. Essas intercorrências são prejudiciais ao tratamento e pioram o prognóstico.

Com o advindo de novas tecnologias, surge então a aplicação de biomarcadores salivares que indicam o estado fisiológico e as alterações ocorridas durante o processo neoplásico do carcinoma. A expressão destes indica alteração dos padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, hiperproliferação, relacionadas com o desenvolvimento do tumor. Esse biomarcador salivar é considerado ideal por estar em contato direto com a lesão, fazendo com que forneça uma avaliação diagnóstica e prognóstica do tumor, indicando sua localização e estadiamento.

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura no período de 2007 a 2017 sobre os achados científicos que descrevem o uso de biomarcadores salivares no

câncer oral, apresentado seus principais tipos com finalidade de diagnóstico, previsão da sobrevida e prognóstico.

Material e método:

Foi verificada a incidência de artigos sobre o tema: Estudo da utilização de biomarcadores salivares no diagnóstico e prognóstico do câncer oral publicados em inglês e português, entre 2007 e 2017 em revistas indexadas, com o uso dos seguintes filtros: artigos de revisão, texto com acesso livre e dos últimos 10 anos, que totalizaram 642 artigos. Da base de dados PUBMED, foram selecionados 34 artigos, no SCIELO foram selecionados 2 artigos. Para esta seleção foram utilizados como descritores os termos: Biomarcadores. Biomarcador Salivar. Câncer Oral. Diagnóstico. Prognóstico. Tratamento. Biomarkers. Salivary biomarkers. Oral cancer. Diagnosis. Treatment. Totalizando ao final 36 artigos.

Para a classificação quanto ao tema estudado, realizou-se uma leitura inicial, que originou categorias temáticas, nas quais os resumos foram alocados em uma leitura posterior. O mesmo ocorreu na análise dos aspectos metodológicos. Após isso, foi feita uma análise dos temas de todos os resumos classificados em cada categoria, a fim de se obter um panorama detalhado da produção científica nacional e internacional sobre os aspectos que o Cirurgião-Dentista deve estar apto a reconhecer sobre o tema biomarcadores salivares no diagnóstico e prognóstico do câncer oral.

Revisão de literatura:

As neoplasias malignas, ou cânceres, se caracterizam por ser um tipo de doença não contagiosa identificada por um crescimento desordenado de células indiferenciadas com capacidade de invadir tecidos adjacentes e metastatizar para locais afastados, onde essas células malignas residem, crescem e re-invaginam tecidos contíguos¹.

Um dos tipos de câncer mais comuns, são os da região da cabeça e pescoço, com taxa de incidência variando em diferentes regiões do mundo, representando, aproximadamente 8-10% de todos os cânceres².

Um dos tipos de câncer com alta predominância é o câncer oral, sendo representado principalmente pelo CCEO que acomete principalmente a língua, lábio inferior e assoalho bucal. Ocupa o sexto lugar entre os cânceres em todo o mundo, ocorrendo duas a três vezes mais em homens e se desenvolvendo por mutações genéticas do epitélio de revestimento bucal⁴.

O índice de sucesso no prognóstico do CCEO é de 90%, desde que haja a detecção precoce. O atraso no diagnóstico do câncer de boca é causado pela falta de informação dos pacientes, por suas diferentes situações socioeconômicas e culturais e, principalmente, por falha dos cirurgiões dentistas e médicos. O dentista tem uma contribuição importante no exame clínico preventivo para o câncer de boca, o qual deve ser incorporado como uma rotina em suas consultas⁵.

Um dos desafios atuais para reduzir a mortalidade do câncer é o desenvolvimento de estratégias para identificar e detectar o CCEO quando em estágio inicial, permitindo uma rápida intervenção e terapias mais eficazes. A detecção padrão da doença baseia-se no exame clínico e na análise histológica de áreas suspeitas através da biópsia, porém o método pode não detectar e/ou ser ineficaz em sítios ocultos⁶.

As células tumorais produzem substâncias bioquímicas que são nominadas como marcadores tumorais. Podendo estes ser produtos endógenos normais, os quais são produzidos em maior escala em células cancerosas ou os produtos de genes recém-mutados que permanecem quiescentes nas células normais⁷.

Os marcadores tumorais podem se apresentar como substâncias intracelulares em tecidos, fluidos circulantes, como soro, urina, líquido cefalorraquidiano e saliva. Com as novas tecnologias de diagnóstico, o papel da saliva como ferramenta para o diagnóstico do câncer oral avançou exponencialmente⁷.

Estudos alternativos para detecção do câncer usando moléculas biológicas envolvendo o mecanismo molecular da carcinogênese, podem revelar importantes dados de diagnóstico, podendo ser chamados de biomarcadores⁸.

O Instituto Nacional do Câncer define um "biomarcador" como sendo uma molécula biológica encontrada no sangue, em fluidos corporais e tecidos servindo como um indicador de um processo normal ou anormal, ou de uma condição de doença, tal como o câncer⁸.

Biomarcadores podem ser usados para avaliação de pacientes em variadas situações clínicas, avaliando o risco de doença, diferenciando um câncer primário oculto, diferenciando achados benignos de malignos, determinando prognóstico, rastreando e monitorando o estado da doença, podendo detectar recorrência ou auxiliar na resposta ao tratamento⁹.

Um biomarcador ideal para o câncer, deve ser um exclusivo indicador de malignidade e deve confirmar e definir quaisquer fatores que possam confundir a existência de tecido maligno e/ou benigno, devendo produzir resultados válidos, confiáveis e definitivos¹⁰.

Biomarcadores sensíveis e específicos para CCEO podem ser úteis na triagem de pacientes de risco, e devem responder aos seguintes critérios: a alteração pode ser mensurada objetivamente; deve ser mensurável em pequenos espécimes; deve ser alterada nos tecidos de alto risco e não nos tecidos normais; e deve ser alterado já nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer¹¹.

Os biomarcadores salivares são uma ferramenta confiável no diagnóstico de CCEO, devido seu contato direto com as lesões. A saliva é tida como um potente biomarcador por possuir proteínas expressas localmente, tais como: alfa-amilase, lactoferinas, lisozimas, proteínas ricas em prolina, mucinas, histatinas, cistatinas e transferrina¹².

O potencial de diagnóstico da saliva não apenas se limita apenas às doenças da cavidade oral, mas também a alterações de condições sistêmicas. A saliva humana é rica em proteínas, peptídeos, hormônios e enzimas, podendo ser facilmente usadas para avaliação de diferentes doenças. Atua ainda, como um reservatório de esteroides, aminas, peptídeos, melatonina, insulina, leptina, enzimas secretoras de IgA, outras enzimas e drogas, podendo ser usada para avaliar a toxicidade, níveis infecciosos, imunológicos e hormonais do corpo humano¹³.

As mudanças de concentração dos solutos presentes na saliva podem ser usadas como biomarcadores para diagnóstico do câncer oral em estágio inicial ou monitorar a resposta ao tratamento terapêutico. Como ferramenta não invasiva de fácil manuseio, a saliva permite que o paciente colete suas próprias amostras em casa, economizando custos de saúde, permitindo amostragem conveniente e múltipla, além de ter um impacto positivo na conformidade e comodidade do paciente¹⁴.

O surgimento e desenvolvimento de lesões malignas estão associados a mutações do DNA específicas, que podem ser encontradas na saliva, plasma ou outros fluidos corporais. Essas mutações podem ser usadas como biomarcadores para diagnosticar tumores orais¹⁵.

Os biomarcadores salivares para o câncer oral podem ser divididos em biomarcadores baseados em proteínas e em RNA. Os biomarcadores baseados em proteínas incluem um grupo de citocinas, fator de crescimento de fibroblastos, cyfra 21-1, antígeno de câncer 125,

metaloproteinases de matriz. Os biomarcadores baseados em RNA incluem os RNAs mensageiros e os microRNAs¹².

Outros biomarcadores para detecção do CCEO são os níveis de microRNA presentes na saliva, sendo o miR-125 e o miR-200, os mais usados. Indivíduos saudáveis apresentam níveis mais baixos de microRNAs em comparação aos pacientes com CCEO, indicando que a detecção de miRNAs da saliva, têm uma aplicação potente na detecção do câncer bucal¹⁶.

As proteínas salivares também podem ser usadas para diagnóstico do câncer. Nota-se que o aumento do antígeno tumoral CA15-3 e de anticorpos marcadores de proteínas tumorais c-erbB2, CA-125 e P53 na saliva de pacientes com CCEO podem indicar estas proteínas como biomarcadores salivares para o câncer oral¹⁷.

Níveis de Interleucinas 4,10,13 e 1RA mostram-se elevados na saliva de pacientes com CCEO, podem indicar estas proteínas como biomarcadores salivares o diagnóstico da doença. Algumas citocinas, como IL6, IL8 presentes na saliva podem ser usadas para a detecção de CCEO ajudando na classificação histológica e no estadiamento clínico¹⁸.

A proteína GRP78 tem se mostrado ser um biomarcador que pode ser empregado para determinar o prognóstico e a capacidade de recorrência nos pacientes com câncer de boca pós-tratamento (cirúrgico, radioterapia ou quimioterapia), a sua diminuição significativa está correlacionada com o prognóstico do tecido tumoral¹⁹.

Discussão:

No presente estudo, diversas modalidades de diagnóstico para o CCEO foram encontradas, e as mesmas variam entre invasivas e não invasivas¹⁷.

Conforme verificado na presente revisão, o exame feito através da coleta da saliva traz conforto ao paciente, além de fácil armazenamento, pois diferentemente do sangue, ela não coagula e é um exame de baixo custo¹⁴.

Além de aumentar a remineralização do esmalte do dente e prevenir a desmineralização devido à sua capacidade de armazenamento de minerais, a saliva age protegendo também a mucosa oral de fatores biológicos, mecânicos e químicos, ainda são encontrados biomarcadores tumorais, os quais identificam substâncias alteradas no organismo como proteínas e peptídeos¹³.

Diante das formas de biomarcadores tumorais, o que mais se destacam na detecção CCEO são os biomarcadores salivares, que devido ao seu contato direto com a lesão, ajudam nas medidas preventivas através da detecção de diversas fases de transformação da célula maligna⁸.

Na presente revisão, foram identificados vários tipos de biomarcadores salivares, dentre eles, os que mais se destacam são os baseados em proteínas e material genético¹².

Os baseados em proteínas, incluem um grupo de citocinas pró-inflamatórias, que desempenham papel importante no início da resposta inflamatória de fase aguda de infecções ou lesões. Fator de crescimento de fibroblastos também é um marcador tumoral que atua em diferentes etapas do desenvolvimento de um organismo e destaca-se na sua ação como fator angiogênico e reparador de tecidos¹².

Outra proteína presente como marcador tumoral é a metaloproteinase de matriz, que compreende uma família de proteinases que têm sido relacionadas à remodelação da MEC (matriz extracelular) e cicatrização de feridas, no tecido exercem o papel de catabolismo das regiões da matriz extracelular que precisa ser reparada¹⁷.

Ainda de acordo com as proteínas, a p53 é codificada pelo cromossoma 17, sua principal função é a manutenção da integridade do código genético, resultando na manutenção da mesma sequência de nucleotídeos ao longo de toda a molécula de DNA. Em casos onde há danos no DNA, caberá à proteína p53 impedir que a célula em questão entre em mitose e complete a divisão celular¹⁷.

No que se refere aos segmentos do DNA, o molde para a síntese do RNAm localiza-se em diversos cromossomos das células, na maioria das vezes separados por longos segmentos de DNA não-codificante, e os micro-RNAs que são um grupo de pequenos RNAs não-codificadores de proteínas que possuem a capacidade de modular uma enorme e complexa rede regulatória de expressão dos genes¹⁶.

Portanto, os miRNAs presentes são sintetizados a partir de genes específicos ou de determinadas regiões gênicas que não estão relacionadas à produção de proteínas. A presente revisão, mostrou que a saliva saudável contém 50 mi-RNAs. Dois deles são miR-125a e miR-200^a os quais podem discriminar pacientes com ou sem CCEO¹⁶.

Observa-se níveis de interleucinas como, IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1RA também se encontram elevados na saliva de pacientes com CCEO. A utilização de antígeno tumoral CA 15-3 e os anticorpos marcadores de proteínas tumorais como c-erB2 (oncoproteína), CA-125 e p53 na saliva, também têm potente aplicação na detecção do câncer oral²⁰.

Estudos mostram que cerca de 30% dos pacientes não se beneficiam dos medicamentos indicados, sendo que uma parcela chega a falecer. Cada indivíduo possui respostas diferenciadas a determinados produtos, dependendo de características genéticas, comportamentais e nutricionais. Nesse contexto, médicos utilizam séries de medicamentos até encontrar o mais eficaz, prática que resulta em gastos maiores na cadeia da saúde. Já com o

uso de biomarcadores é possível chegar diretamente ao medicamento mais efetivo para determinado paciente¹⁹.

A partir da revisão literária realizada, nota-se que biomarcadores salivares podem detalhar quais tipos de proteínas presentes na saliva estão alterados, e qual o nível de malignidade da doença quando comparados aos níveis de pacientes saudáveis. O índice de sucesso no prognóstico é relativamente alto desde que haja a detecção precoce do CCEO¹⁹.

Como sendo uma tecnologia nova de descoberta do CCEO, resultados de vários estudos ainda são incompletos, diante disso, mais pesquisas ainda deverão ser realizadas para que se aprofundem e obtenham valores suficientes e em futuro próximo esse método de biópsia líquida seja usada como padrão ouro, pois já é sabido que seus méritos se sobressaem ao método padrão de diagnóstico.

Conclusão:

De acordo com a literatura pertinente consultada e os objetivos traçados neste trabalho, pode-se concluir que:

- Apesar do grande avanço no uso de biomarcadores para diagnóstico de CCEO, ainda falta explorar seu uso com relação ao prognóstico da doença.
- Os biomarcadores salivares utilizados no diagnóstico são as proteínas e RNA, quando esses estão em níveis alterados têm-se confirmação da doença.
- O uso de biomarcadores apresentam vantagens, por serem menos invasivos e conseguirem uma detecção precoce do CCEO em comparação a biópsia.
- Os principais biomarcadores salivares de proteína são as citocinas, fator de crescimento de fibroblastos, cyfra 21-1, antígeno de câncer 125, metaloproteinases de matriz.

- A proteína GRP78 pode ser empregada para determinar o prognóstico de pacientes com CCEO, além da capacidade de recorrência pós tratamento.
- Biomarcadores salivares são usados na avaliação do paciente, estima o risco da doença, busca o ocultismo de cânceres primários, determinam o prognóstico e monitoramento da doença.

Referências:

1. Neville BW, et al. Patologia Oral & Maxilofacial. 4.ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier, 2009.
2. Santarelli A, Lo Russo L, Bambini F, Campisi G, Lo Muzio L. New perspectives in medical approach to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Minerva Stomatol.* 2009; 58: 445–52.
3. Pathak KA, Al Hajjaj H, Viallet NV, Sutherland DS, Kerr PD, Nason RW. Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Influence of site of primary tumor. *Oral Abstr.* 2009; Suppl 3 (1): 73.
4. Barnes L; Organization WH and Cancer IAfRo. Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization, 2016.
5. Almeida OP. Patologia Oral. São Paulo: Artes Médicas, 2016.
6. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010; 46: 226–31.
7. Malati T. Tumour markers: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 2007; 22: 17–31.

8. Mishra, A., Verma, M. Cancer biomarkers – are we ready for the prime time? *Cancers*. 2010; 2(1): 190–208.
9. Yoon AJ, Shen J, Santella RM, Zegarelli DJ, Chen R, Weinstein IB. Activated checkpoint kinase 2 expression and risk for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007; 16: 2768-72
10. Brooks JD. Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res*. 2012; 22: 183-7.
11. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2010; 46: 226–31.
12. Shah F. D., Begum R., Vajaria B. N., Patel K. R., Patel J. B., Shukla S. N., Patel P. S. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2011; 26(4): 326–334.
13. Khurshid Z., Zohaib S., Najeeb S., Zafar M.S., Slowey P.D., Almas K. Human saliva collection devices for proteomics: An update. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17: E846 doi: 10.3390/ijms17060846.
14. Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res*. 2009; 12: 206-211.
15. Wang Y, Springer S, Mulvey CL et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015; 7(293): 293ra104.

16. Park NJ, Zhou H, Elashoff D et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(17): 5473–5477.
17. Wong DT. Salivary diagnostics. *Oper Dent.* 2012; 37(6): 562-570.
18. Pushalkar S, Mane SP, Ji X et al. Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 61(3): 269–277.
19. Huang TT, Chen JY, Tseng CE, Su YC, Ho HC, Lee MS, *et al.* Decreased GRP78 protein expression is a potential prognostic marker of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Formos Med Assoc.* 2010; 109: 326-37.
20. Aziz S, Ahmed SS, Ali A et al. Salivary immunosuppressive cytokines IL-10 and IL-13 are significantly elevated in oral squamous cell carcinoma patients. *Cancer Invest* 2015; 33(7): 318–328.