

FUNCIÓN VISUAL Y OCULAR: POSIBLES BIOMARCADORES DE NEUROTOXICIDAD POR PESTICIDAS

Sandra Carolina Durán Cristiano

Universidad de la Salle, Facultad de Ciencias de la Salud, Bogotá- Colombia
Programa Optometría
sduran@unisalle.edu.co

RESUMEN

El sistema visual está regulado en gran parte por el sistema nervioso y modula respuestas de los estímulos visuales, gracias a la constante interacción entre estructuras oculares y neurotransmisores, entre ellos la acetilcolina. Por lo tanto, la actividad colinérgica se requiere tanto para funciones del segmento anterior como posterior, y cambios en dicha actividad podría ocasionar alteraciones oculares. Es así, que numerosas investigaciones sugieren que desregulación en la actividad colinérgica, como es el caso de la neurotoxicidad por pesticidas tales como los organofosforados, podrían tener una implicación negativa en la visión. Por lo tanto, el objetivo del estudio es determinar cambios en la función visual y ocular en individuos expuestos a pesticidas. Para esto, se realizó un estudio de casos y controles, a quienes se les aplicaron pruebas de función visual como la sensibilidad al contraste, estereopsis y visión al color y pruebas de función ocular, entre ellas, tiempo de ruptura lagrimal, citología de impresión conjuntival, prueba de cantidad lagrimal con Schirmer y evaluación de sintomatología ocular y neurotoxicidad con las pruebas de Donate y Q16, respectivamente. Adicionalmente, se midió la actividad colinesterasa en sangre y lágrima. Resultados: Respecto a las pruebas de función visual, se encontraron cambios estadísticamente significativos en la sensibilidad al contraste en las frecuencias bajas en el grupo expuestos a los pesticidas, en comparación con el grupo control. Por otro lado, en la función ocular, se encontraron cambios significativos en el enrojecimiento ocular, cambios celulares en la conjuntiva y presencia de hipersecreción lagrimal, este último, de interés teniendo en cuenta los síntomas reportados en individuos con síndrome colinérgico asociado a toxicidad por pesticidas. Conclusión: La hipersecreción lagrimal y la disminución en las frecuencias bajas de la sensibilidad al contraste podrían ser posibles biomarcadores de neurotoxicidad por pesticidas.

Palabras clave: Acetilcolinesterasa, Pesticidas, Función visual, Función ocular, Neurotoxicidad

ABSTRACT

The visual system is largely regulated by the nervous system and modulates responses to visual stimuli, thanks to the constant interaction between ocular structures and neurotransmitters, including acetylcholine. Therefore, cholinergic activity is required for

both anterior and posterior segment functions, and changes in this activity could lead to ocular disturbances. Thus, many investigations suggested that dysregulation of cholinergic activity, such as neurotoxicity due to pesticides such as organophosphates, could have a negative impact on vision. Therefore, the objective of the study is to determine changes in visual and ocular function in individuals exposed to Agrochemicals. For this, a case-control study was carried out, to whom visual function tests such as contrast sensitivity, stereopsis and color vision and ocular function tests were applied, among them, tear rupture time, conjunctival impression cytology, tear quantity test with Schirmer, and evaluation of ocular symptoms and neurotoxicity with the Donate and Q16 tests, respectively. In addition, cholinesterase activity was measured in blood and tear. Results: Regarding the visual function tests, statistically significant changes were found in contrast sensitivity at low frequencies in the group exposed to pesticides, compared to the control group. On the other hand, in ocular function, significant changes were found in eye redness, cellular changes in the conjunctiva, and the presence of tear hypersecretion, the latter of interest considering the symptoms reported in individuals with cholinergic syndrome associated with pesticide toxicity. Conclusion: Lacrimal hypersecretion and decreased contrast sensitivity in low frequencies could be possible biomarkers of pesticide neurotoxicity.

Keywords: Acetylcholinesterase, Pesticides, Visual function, Ocular function, Neurotoxicity

1. INTRODUCCIÓN

La generación de empleo en el sector agrícola se ha incrementado en los últimos años como estrategia del desarrollo económico y productivo contemplado en el plan nacional de desarrollo de Colombia (PND) (1). Esto ha permitido en gran parte mejorar la calidad de vida de la población. Sin embargo, la exposición de las personas que ejercen este oficio a agentes agroquímicos pueden inducir afectación negativa en la salud como efectos de neurotoxicidad (2).

La función del sistema visual está regulada neuronalmente, con neurotransmisores como la acetilcolina (ACh), la cual modula funciones como respuesta pupilar, visión cromática, sensibilidad al contraste y regulación de las estructuras de la superficie ocular (3,4). Así, la desregulación de esta función colinérgica por enzimas como la acetilcolinesterasa (AChE) podría inducir cambios en la sensibilidad al contraste, visión del color y superficie ocular. Se ha demostrado que el aumento en la ACh mejora la plasticidad cortical y su funcionamiento al refinar la eficacia de los circuitos neuronales y mejorar el aprendizaje perceptual. De igual forma la potenciación colinérgica reduce la magnitud y duración de la plasticidad perceptiva del dominio ocular inducida por unas pocas horas de parcheo monocular (5) y la estimulación del sistema colinérgico incrementa significativamente la amplitud de los potenciales visuales evocados durante horas (6).

En consecuencia, varias investigaciones sugieren el rol del sistema visual en enfermedades colinérgicas, tal es el caso de la enfermedad de Alzheimer, donde se han reportado alteraciones en funciones visuales y oculares. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es determinar cambios en la función visual y ocular en individuos expuestos a pesticidas.

2. TEORÍA

El uso de agentes fertilizantes y pesticidas se han considerado una buena estrategia para mantener el rendimiento de los cultivos y su alta demanda en los últimos años sugiere que es un sector de relevancia para mantener la económica mundial (7). A pesar de ser un sector que genera una cantidad importante de recursos económicos en una nación, es de anotar que los efectos que pueden ocasionar por su mal uso dichos agentes químicos se han descrito, relacionado a la contaminación del agua, aire y afectan de manera negativa la salud animal y la salud humana, siendo esta última, el interés de este proyecto.

Hoy día, la sociedad se ve enfrentada a varios dilemas, por un lado, el incremento acelerado de la economía agrícola, que busca apoyar los recursos de los países, más en la crisis sanitaria que se está viviendo a nivel mundial y por otro lado los efectos negativos que se han reportado en el ecosistema, afectando principalmente la salud humana (8,9). En Colombia, en el reporte del año 2020 por parte del instituto nacional de salud (INS), se reportó un elevado número de intoxicaciones por sustancias químicas, siendo la tercera causa: la exposición a plaguicidas (10), por lo anterior, surge la necesidad de realizar actividades de atención primaria en salud para evitar un incremento en dichas cifras.

Gran parte de las sustancias químicas empleadas como fertilizantes y pesticidas pueden ocasionar trastornos en la salud humana de diferentes maneras, bien será induciendo transformación celular en los diferentes tipos celulares, y como resultado de esto la aparición de cáncer como leucemia, cáncer pulmonar, pancreático etc (11), alteraciones en la respuesta inmunológica y por último, pero no menos importante alteraciones en el sistema nervioso, que afecta funciones vitales como la respiración, la función cardiaca, metabólica y órganos sensoriales entre ellos la visión (12). De los pesticidas que se encuentran en el comercio, se encuentran los organofosforados, carbamatos, siendo su mecanismo de acción la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y con ello generan un proceso de acumulo de acetilcolina, que finalmente produce la sobreestimulación de sus receptores y la desensibilización de los mismo, con ello afecta la respuesta celular que regula la función colinérgica, entre ellas la respiración, la toxicidad nerviosa y finalmente ocasiona muerte de los distintos organismos conocidos como plaga de cultivos (herbicidas, insecticidas, fungicidas y raticidas). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de dichas sustancias pueden ocasionar efectos no deseados en el aire, agua, animales y el ser humano; entre estas propiedades se encuentran su peso molecular, su lipofilicidad lo cual permite, ingresar mediante los órganos sensoriales, atravesar las barreras anatómicas y físicas y finalmente ocasionar daño en el sistema nervioso ocasionando un efecto de neurotoxicidad (13).

El sistema visual está encargado de recibir, procesar e interpretar la información del entorno a partir de un estímulo luminoso, esto implicado una serie de funciones para que finalmente sea interpretada dicha información. Para esto, el sistema visual procesa la información mediante diferentes mecanismos y funciones entre ellas la función de agudeza visual, sensibilidad al contraste, visión al color, movimientos oculomotores y habilidades visuales etc. Dichas funciones, se encargan de recibir la información y transducirla a regiones corticales, principalmente, la corteza occipital y la corteza prefrontal cuyo rol es regulación del movimiento oculomotor (14).

La información visual inicialmente es recibida y procesada por estructuras oculares, luego, dicho estímulo se transforma en estímulo eléctrico gracias al proceso de fototransducción en la retina y posterior a esto, el estímulo nervioso viaja a través de áreas subcorticales como el núcleo geniculado lateral del hipotálamo hasta llegar a la corteza occipital ((14). Para esto, se requiere de la comunicación neuronal que envía y transmite dicho impulso nervioso, es aquí, donde se centra la importancia de los neurotransmisores como la acetilcolina (15), que mantienen la comunicación interneuronal para que sea interpretada la información visual. Por lo cual, falla en dicho neurotransmisor, podría generar alteración en la comunicación neuronal y por ende en la función visual y ocular.

Por otro lado, la presencia de receptores muscarínicos y nicotínicos en tejido visual ha sido descrito, tal como en el músculo esfínter de la pupila, glándula lagrimal, células epiteliales y endoteliales en la malla trabecular, retina y cuerpo ciliar, en este sentido, una vez se demuestra que la actividad colinérgica hace parte del buen funcionamiento y procesamiento del sistema visual, por ejemplo, Upadhyay & Beurman (2020) demostraron que al inhibir farmacológicamente la actividad de los receptores muscarínicos en el ojo, da como resultado alteraciones en la función acomodativa, respuesta pupilar, drenaje de humor acuoso, producción lagrimal y en general homeostasis de la superficie ocular (16).

De esta manera, se encuentra que el sistema colinérgico (acetilcolina, receptores y la AchE, encargada de la degradación de la Ach), requiere mantenerse en un proceso continuo de homeostasis y la interrupción de esta podría facilitar cambios funcionales visuales. Respecto al uso de pesticidas, muchos estudios demuestran el efecto negativo en la salud en general y visual, teniendo en cuenta el mecanismo de acción de algunas sustancias químicas empleadas en la agricultura, muchas de ellas no solo inhiben la acción de la AchE en las plagas sino en el ser humano puede inhibir su función, encontrando como posibles marcadores de neurotoxicidad algunas funciones visuales como la sensibilidad al contraste, visión al color, respuesta pupilar etc (6,17). Por lo tanto, el objetivo general fue determinar cambios en la función visual y ocular en individuos expuestos a Agroquímicos en Sibaté-Colombia.

3. PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se llevó a cabo en la Clínica de Optometría de la Universidad de la Salle, Bogotá-Colombia una vez fue aprobado por el comité de investigación y ética de la Facultad Ciencias de la Salud. Los procedimientos empleados, se describen brevemente en la Figura 1.

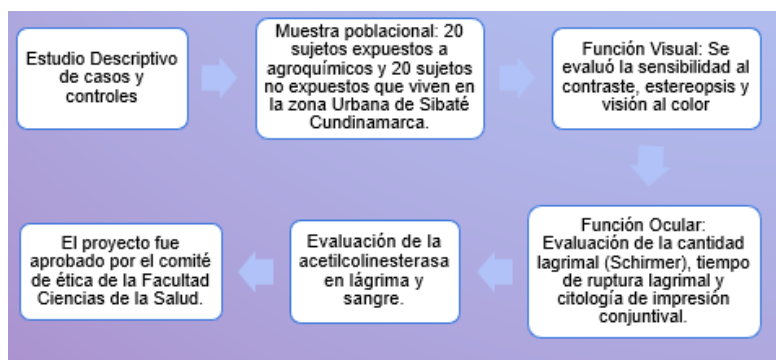


Figura 1. Resumen de los procedimientos empleados

Es de resaltar que el grupo de casos (individuos expuestos al pesticida), el tiempo mínimo de exposición fue de 1 año. Por otro lado, en el grupo control (individuos no expuestos), no se incluyeron personas con enfermedad metabólica como la diabetes, enfermedad hepática, neurológica o que esté tomando tratamiento neurológico, infección sistémica y mujeres en estado de embarazo.

Procedimientos Empleados:

➤ **Evaluación del Estado Refractivo**

Se realizó un examen de optometría que incluyó agudeza visual mediante la pantalla con valores en logMAR, refracción, examen motor y oftalmoscopia directa.

Evaluación de la Función Visual y Ocular

- Visión del color (Farnsworth Munsell Hue15): Se evaluó la visión cromática en búsqueda de deuteranomalía, deuteranopia, protanomalía, protanopia, tritanomalía y tritanopia).
- La prueba de sensibilidad al contraste se realizó mediante un programa computarizado basada en el patrón de Gabor y la de fusión crítica se diseñó con base en el fenómeno de doble frecuencia teniendo en cuenta frecuencias de 0.5, 1, 3, 6 y 12.
- Test de Schirmer: se siguió el protocolo (18), sin anestesia tópica, se inserta la tirilla de papel mer (5x35mm) en el margen palpebral inferior en cada ojo, y
- Hiperemia conjuntival: grado de enrojecimiento conjuntival se evaluara acorde a la escala reportada por (19).
- Cuestionario de Sintomatología: Se aplicó el cuestionario de Donate, dadas sus características en la detección de la sintomatología ocular en ojo seco (20).
- Citología de Impresión Conjuntival: Para la citología de impresión se utilizó membranas de ésteres de acetato de celulosa HAWPO4700, poro 0,45 μm (Millipore corporación, Billerica). Se siguió el protocolo empleado por Murube et al, 2013.

Análisis de Datos:

Se utilizó el programa STATA versión 10 (Inc., Chicago, IL, USA), con el fin de establecer promedios, frecuencias de cada variable. Asimismo, se realizó análisis inferencial.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aspectos Sociodemográficos

Dentro de las características generales, la edad promedio de los participantes del grupo control (no expuestos a pesticidas) fue de 40,22 años y del grupo casos (expuestos a pesticidas) fue de 35,62. Respecto al nivel de la escolaridad, en el grupo control se encontró que un 2% cursaron primaria, 81% secundaria y 17% pregrado. En cuanto al género, en el

grupo control un 82% fueron hombres y un 18% mujeres, mientras que en el grupo casos, un 49% de los participantes fueron hombres y un 51% mujeres.

Es de resaltar, que todos los participantes con su mejor corrección fueron tuvieron una agudeza visual de 0.1 logMAR.

4.2 Función Visual

Dentro de las funciones visuales importantes para que haya un proceso de percepción visual adecuada se requiere de la acomodación, visión cromática y sensibilidad al contraste, siendo esta de interés, teniendo en cuenta su relevancia clínica en la determinación de calidad visual. Interesantemente, las frecuencias bajas que se evaluaron, en el grupo de casos se encontró estadísticamente disminuidas comparada con el grupo control (figura 2), un aspecto que llamo la atención, dado que las frecuencias bajas están relacionadas con actividad cortical y cambios en dicha actividad podría asociarse a un déficit visual como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (21).

En consecuencia, algunas investigaciones soportan que la sensibilidad podría ser una prueba visual en la detección temprana de la enfermedad colinérgica (22). Pese a que las tres frecuencias espaciales (bajas, medias y altas) se encontraron reducidas en los participantes expuestos a los pesticidas, llama la atención la reducción en las frecuencias bajas, acorde a la evidencia entre daño en el sistema nervioso y reducción en la sensibilidad al contraste específicamente las frecuencias bajas.

De igual manera, Herrero et al (2017), resaltan que la sensibilidad al contraste es una función regulada por el sistema colinérgico tanto en modelos murino como en humanos (23), lo cual confirma su relación con enfermedades colinérgicas como el Alzheimer y el Glaucoma. Nuestros resultados, sugieren que la sensibilidad al contraste de manera especial, sus frecuencias bajas se encuentran alteradas en personas expuestas a pesticidas cuyo mecanismo es la inhibición de la acetilcolinesterasa, lo cual podría ser asociado a una desregulación del sistema colinérgico a causa del pesticida.

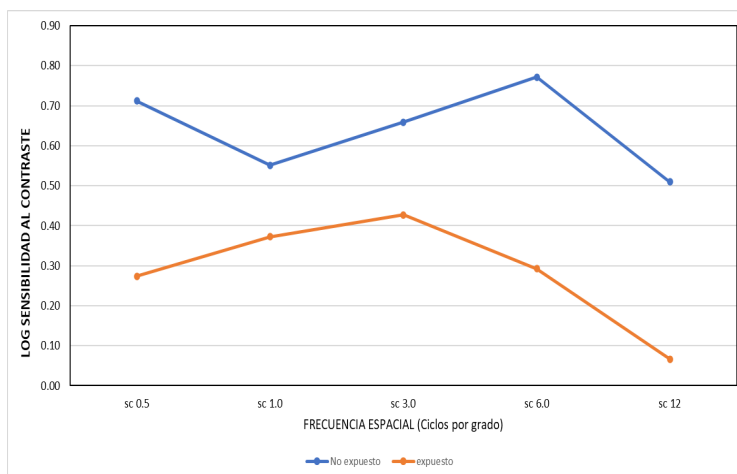


Figura 2. Valor de sensibilidad al contraste en las frecuencias bajas (0.5, 1.0), medias (3.0, 6.0) y altas (12) en individuos expuestos a pesticidas y no expuestos

4.3 Función Ocular

Las estructuras de la superficie ocular muestran una gran actividad colinérgica, tales como la córnea, conjuntiva, glándulas de meibomio y glándula lagrimal (24,25). Esta última de interés en este estudio, ya que se ha demostrado dentro del síndrome colinérgico asociado al uso de pesticidas, síntomas característicos como lo es el lagrimeo y salivación. Curiosamente, en nuestros resultados se pone en evidencia que 64% de los participantes del grupo caso presentaron hipersecreción lagrimal, lo cual podría sugerir varios puntos. El primero que la desregulación colinérgica podría inducir un proceso de desensibilización en los receptores muscarínicos M3 localizados en la glándula lagrimal e inducir el lagrimeo y segundo, que esta hipersecreción lagrimal podría en efecto ser un posible marcador en la detección temprana de neurotoxicidad por pesticidas.

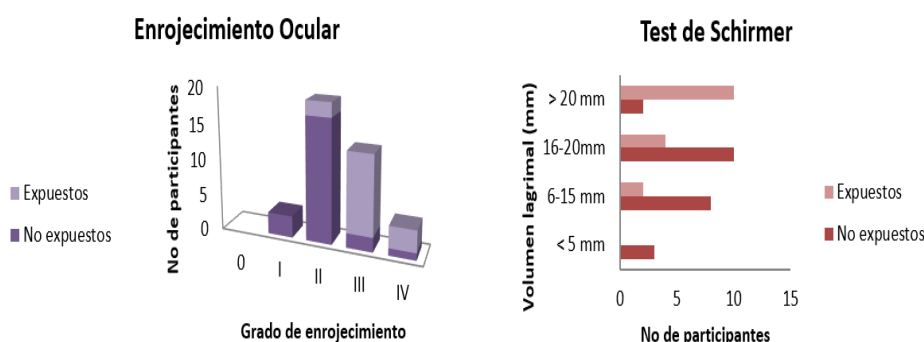


Figura 3. Cambios en la superficie ocular en individuos expuestos a pesticidas y no expuestos

Por otro lado, evaluando el enrojecimiento ocular acorde a la escala de Nathan & Efron, se encontró que en el grupo control presentaron enrojecimiento ocular leve, comparado con el grupo caso quienes tuvieron un mayor grado de severidad en la hiperemia conjuntival. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de ruptura lagrimal (TBUT), se puede sugerir que el ojo desde el concepto fisiológico ocular y visual podría ser blanco de los pesticidas y que puede ser incorporado en la detección temprana de neurotoxicidad. Es de destacar, que en cuanto a la prueba de Schirmer, que evalúa la cantidad lagrimal tiene una íntima relación con la actividad colinérgica. En efecto, Bacman et al, respaldan que la actividad de secreción lagrimal y factores de crecimiento a partir de dicho fluido, son moduladas por la acción de receptores muscarínicos, en especial el tipo M3, quien una vez se une a la Ach regula la secreción lagrimal (26). En nuestro estudio, se encontró que los participantes expuestos a los pesticidas (inhibidores de colinesterasa), presentaron una mayor secreción, respecto a los valores normales y a los valores encontrados en la población no expuesta. Un síntoma característico del síndrome colinérgico asociado a neurotoxicidad por pesticidas, lo cual podría reflejar que los participantes expuestos pueden estar presentando algún grado de neurotoxicidad (17).

5. CONCLUSIONES

- La hipersecreción lagrimal y la disminución en las frecuencias bajas de la sensibilidad al contraste podrían ser posibles biomarcadores de neurotoxicidad por pesticidas.

6. REFERENCIAS

- [1] Cárdenas Pinzón JI, Vallejo Zamudio LE. Agriculture and rural development in Colombia 2011-2013: an approach. *Apunt del Cenes*. 2016;35(62):87–123.
- [2] Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ* [Internet]. 2017; 575:525–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- [3] Dieckmann G, Fregni F, Hamrah P. Neurostimulation in dry eye disease—past, present, and future. *Ocul Surf* [Internet]. 2019;17(1):20–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2018.11.002>
- [4] Kolodziejczyk A. Neurotransmitters in the visual system of the fruitfly,. 2007;1–22. Available from: [file:///Users/Nadine/Documents/Library.papers3/Reports/2007/Kolodziejczyk/2007 Kolodziejczyk.pdf%0Apapers3://publication/uuid/174895A9-2083-4189-AD21-2432A8F315E0](file:///Users/Nadine/Documents/Library.papers3/Reports/2007/Kolodziejczyk/2007%20Kolodziejczyk.pdf%0Apapers3://publication/uuid/174895A9-2083-4189-AD21-2432A8F315E0)
- [5] Sheynin Y, Chamoun M, Baldwin AS, Rosa-Neto P, Hess RF, Vaucher E. Cholinergic Potentiation Alters Perceptual Eye Dominance Plasticity Induced by a Few Hours of Monocular Patching in Adults [Internet]. Vol. 13, *Frontiers in Neuroscience*. 2019. p. 22. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00022>
- [6] Kang J Il, Huppé-Gourgues F, Vaucher E. Boosting visual cortex function and plasticity with acetylcholine to enhance visual perception. *Front Syst Neurosci*. 2014;8:172.
- [7] Magauzi R, Mabaera B, Rusakaniko S, Chimusoro A, Ndlovu N, Tshimanga M, et al. Health effects of agrochemicals among farm workers in commercial farms of Kwekwe district, Zimbabwe. *Pan Afr Med J* [Internet]. 2011/07/11. 2011;9:26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22145061>
- [8] Mabe FN, Talabi K, Danso-Abbeam G. Awareness of Health Implications of Agrochemical Use: Effects on Maize Production in Ejura-Sekyedumase Municipality, Ghana. Tsadilas C, editor. *Adv Agric* [Internet]. 2017;2017:7960964. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/7960964>
- [9] Sellare J, Meemken E-M, Qaim M. Fairtrade, Agrochemical Input Use, and Effects on Human Health and the Environment. *Ecol Econ* [Internet]. 2020;176:106718. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921800920303566>
- [10] Instituto Nacional de Salud (Colombia). Intoxicaciones por sustancias químicas Periodo epidemiológico IX. Colombia 2020. 2020;0–1. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/INTOXICACIONES PE XIII 2020.pdf>
- [11] Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ. Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Can Fam Physician* [Internet]. 2007 Oct;53(10):1704–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17934034>

- [12] Dementi B. Ocular effects of organophosphates: A historical perspective of saku disease. *J Appl Toxicol* [Internet]. 1994 Mar 1;14(2):119–29. Available from: <https://doi.org/10.1002/jat.2550140214>
- [13] Sandoval-Herrera N, Mena F, Espinoza M, Romero A. Neurotoxicity of organophosphate pesticides could reduce the ability of fish to escape predation under low doses of exposure. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):10530. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46804-6>
- [14] Hejtmancik JF, Nickerson JM. Overview of the Visual System. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;134:1–4.
- [15] Gratton C, Yousef S, Aarts E, Wallace DL, D’Esposito M, Silver MA. Cholinergic, But Not Dopaminergic or Noradrenergic, Enhancement Sharpens Visual Spatial Perception in Humans. *J Neurosci*. 2017 Apr;37(16):4405–15.
- [16] Upadhyay A, Beuerman RW. Biological Mechanisms of Atropine Control of Myopia. *Eye Contact Lens* [Internet]. 2020 May;46(3):129–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31899695>
- [17] Jaga K, Dharmani C. Ocular toxicity from pesticide exposure: A recent review. *Environ Health Prev Med* [Internet]. 2006 May;11(3):102–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21432383>
- [18] Li N, Deng XG, He MF. Comparison of the Schirmer I test with and without topical anesthesia for diagnosing dry eye. *Int J Ophthalmol*. 2012;5(4):478–81.
- [19] Efron N, Brennan NA, More J, Rieper K. Temperature of the hyperemic bulbar conjunctiva. Vol. 7, *Current Eye Research*. 1988. p. 615–8.
- [20] Donate J, Benítez del Castillo JM, Fernández C, García Sánchez J. [Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye]. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2002 Sep;77(9):493–500.
- [21] Risacher SL, WuDunn D, Pepin SM, MaGee TR, McDonald BC, Flashman LA, et al. Visual contrast sensitivity in Alzheimer’s disease, mild cognitive impairment, and older adults with cognitive complaints. Vol. 34, *Neurobiology of Aging*. 2013. p. 1133–44.
- [22] Lenoir H, Siéoff É. Visual perceptual disorders in Alzheimer’s disease. Vol. 17, *Geriatric et psychologie neuropsychiatrie du vieillissement*. 2019. p. 307–16.
- [23] Herrero JL, Gieselmann MA, Thiele A. Muscarinic and Nicotinic Contribution to Contrast Sensitivity of Macaque Area V1 Neurons. *Front Neural Circuits*. 2017;11:106.
- [24] Chernyavsky AI, Galitovskiy V, Shchepotin IB, Jester J V, Grando SA. The acetylcholine signaling network of corneal epithelium and its role in regulation of random and directional migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Sep;55(10):6921–33.
- [25] Mitchelson F. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on ocular function. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;(208):263–98.

- [26] Bacman S, Berra A, Sterin-Borda L, Borda E. Muscarinic Acetylcholine Receptor Antibodies as a New Marker of Dry Eye Sjögren Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001 Feb 1;42(2):321–7.