

EL POLIPÉPTIDO ACTIVADOR DE LA ADENILATO CICLASA DE LA PITUITARIA (PACAP): ACTUALIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS

Samuel Mucio-Ramírez*, Carolina Miller-Pérez*, Margarita Curras-Collazo**, Martha León-Olea*

SUMMARY

After the discovery of the hypophysiotropic hypothalamic, factors such as the luteinizing hormone releasing factor, thyrotropin hormone, growth hormone and corticotropin, the releasing factors for the follicle stimulating hormone and that of prolactin were characterized. However, some studies showed that few new cells in adenohypophysis would presumably require their hypothalamic regulator. This opened the possibility for the existence of a new hypophysiotropic factor. Eventually in 1998, a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) was discovered by Miyata et al. Its name arises from the effect it exerts on pituitary cells by increasing cyclic AMP (cAMP) levels, and consequently originating the release of various hypophysial hormones, i.e., prolactin, oxytocin, vasopressin and growth hormone, among others. It has been reported that PACAP regulates important biological functions in vertebrates, being among the most relevant its role as a hypophysiotropic factor and neuromodulator. Furthermore, PACAP produced vasodilation, bronchodilation, activation of intestinal motility, increase of insulin and histamine secretion, as well as stimulation of cell multiplication and/or differentiation. This review paper provides the most recent information on the diverse physiological roles that PACAP and its receptors exert on the Central Nervous System (CNS) and on other systems. The wide anatomical distribution of this polypeptide and that of its receptors has drawn the interest of various research groups in trying to elucidate the pharmacological effects and biological functions in which PACAP participates. This peptide consists of 38 amino acids and was isolated from ovine hypothalamic extracts. Two biologically active forms exist: one having 38 residues and a truncated one of 27 residues. Both peptides are amidated in their carboxyl terminal. It is widely distributed in SNC, Peripheral Nervous System and in cells of various tissues and organs of different animal species. PACAP belongs to the superfamily secretin/growth hormone (GH)/glucagon/vasoactive intestinal polypeptide (VIP), and from a phylogenetic point of view, it has the most preserved sequence. PACAP shares a highly structural

homology with all the peptides belonging to this family, mainly with porcine VIP, showing a 68% homology in its amino terminal portion. The molecular cloning of the complementary DNA of the PACAP-38 precursor of rat, mouse and human showed that the amino acid sequence was 100% identical for all of them. The PACAP sequence has been identified in different vertebrate species and in some invertebrates such as tunicates and annelids. PACAP from these species shows a high degree of identity with human PACAP, the only difference lying in one- to four-amino acids. This amino acid conservation pattern in the various animal species shows the biologic relevance of this neuropeptide. Phylogenetic evidence suggest that the PACAP gene originated from the duplication of an ancestral common gene of the superfamily secretin/GH/glucagon/VIP. Therefore, the general organization of the PACAP gene holds a great similitude with that of VIP and the rest of the members of this superfamily. In 1992 Hosoya et al. cloned the human PACAP gene, which is located in region p11 of chromosome 18. It is formed by 5 exons and 4 introns. Exon 1 codifies a cryptic protein; exon 2, the signal peptide; exon 3, a spacing protein having no apparent function; exon 4 codifies the so-called PRP peptide with no known biological function, and exon 5 codifies PACAP-38. Several groups have cloned the PACAP receptor and its isoforms. Receptors for PACAP belong to a family of receptors coupled to G proteins having 7 transmembranal domains. PACAP produces its biological effects by binding to at least 3 types of receptors PAC-1, VPAC1 and VPAC2. Receptor PAC-1 has the highest binding affinity for PACAP-38 (Kd 0.5 nM) and to a lesser degree for PACAP-27 (Kd 2.0 nM). PACAP is widely distributed in the CNS, peripheral nervous system, and various glands and organs. Anatomical studies showing the distribution of mRNA encoding PACAP and its receptors reported that this neuropeptide and corresponding receptors are expressed very early in mouse embryonic stages. Studies carried out in the CNS of adult rat reported PACAP-38 and PACAP-27 immunoreactive (IR) cells and fibers in cerebellar cortex, hippocampus, septum, thalamus, supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei, median eminence, medulla oblongata and

*Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica. Subdirección de Neurociencias. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

** Department of Cell Biology University of California.

Correspondencia:

Dra. Martha León-Olea. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370 México, DF. Tel. (5255)5655-2811 ext. 179. Fax: (5255)5655-9980. e-mail: marthalo@imp.edu.mx

Recibido: 30 de octubre de 2003. Aceptado: 21 de enero de 2004.

spinal cord. The highest PACAP concentration outside the CNS lies in the testicles of rat and mouse. Other tissues and organs presenting IR cells and fibers are the gastrointestinal tract, pancreas, retina and some sympathetic ganglia, as well as the following glands: hypophysis, adrenal, pineal and salivary.

PACAP fulfills the criteria for being considered a hypophysiotropic factor, since it is present in hypothalamic neurons projecting to the pituitary-portal system; and in the blood circulating in this system, it interacts with specific receptors localized in pituitary cells and regulates them. PACAP stimulates the synthesis and release of LH and FSH in gonadotropic cells. It also stimulates the somadendritic release of oxytocin and vasopressin. In addition, our group demonstrated that PACAP administration enhances 2 to 9 times vasopressin basal release in hypothalamic and hypophyseal slices *in vitro*. PACAP stimulates melanotropes by increasing POMC genomic expression, and translates its signal through cAMP and inositol phosphate pathways. PACAP increases in a dose dependent manner $\pm$ -MSH and ACTH secretions, at 1nM concentrations. PACAP also modulates prolactin release. In neocortical culture cells, it also stimulates the genomic expression of proenkephalin, which is the precursor of leu- and met-enkephalin. This polypeptide co-localizes with various neurotransmitters and/or neuromodulators in neurons, modulating their release or interacting as a whole to regulate a certain function. Among the most widely studied of these substances one may mention catecholamines, melatonin, histamine, serotonin and nitric oxide (NO). PACAP regulates the activity of male and female gonads. It stimulates testosterone secretion in Leydig cells in a dose dependent manner. In Leydig cells, PACAP activates adenylate cyclase and phospholipase C by interacting with receptor PAC-1. PACAP stimulates estradiol and progesterone secretions in the ovary of the rat. These studies and the presence of PAC-1 receptor in the granulosa cells suggest that PACAP may be an autocrine or paracrine regulator of ovarian function. PACAP activates Ca^{2+} channels, and as a consequence a higher catecholamine release ensues. Similarly, aldosterone secretion is increased; this mineralocorticoid regulates the electrolytic balance via a paracrine mechanism which stimulates the cells in the adrenal cortex. Likewise, it also raises cortisol levels. These findings identify PACAP as a possible adrenal gland neuromodulator in different animal species, and support the hypothesis that PACAP is an important modulator participating in functions related to the hypothalamus-hypophysis-adrenal system. PACAP diminishes nitric oxide production in a dose-dependent manner in PC12 cultured cells, probably by the phosphorylation of the enzyme nitric oxide synthase, thus suggesting a regulatory role for PACAP in the activity of this enzyme. This peptide has been considered a neuroprotective factor, since it protects cortical cells and PC12 cells from glutamate cytotoxic effects. During development, PACAP acts as a neurotrophic factor, while in adult brain it acts rather as a neuroprotective agent.

From what has been previously mentioned, PACAP regulates various relevant biological functions in vertebrates. Still, there are many things waiting to be elucidated with regard to this polypeptide. In this review paper we tried to include the most recent information on the participation of this peptide in diverse physiological actions.

Key words: PACAP, VIP/GH/Glucagon/Secretin superfamily, hypophysiotropic factors, neuroendocrinology.

RESUMEN

Después del descubrimiento de los factores hipotalámicos hipofisiotróficos, como el factor liberador de la hormona luteinizante, de la tirotrófica, de la hormona del crecimiento y de la corticotrofina, se caracterizaron los factores liberadores de la hormona folículo estimulante y de la hormona prolactina. Sin embargo, algunos estudios mostraron que había células no descritas, que supuestamente requerían un factor hipotalámico. Lo anterior llevó a pensar en la existencia de un nuevo factor hipofisiotrófico, lo que a su vez condujo al descubrimiento del polipéptido activador de la adenilato ciclase de la pituitaria (PACAP) por Miyata y colaboradores en 1998. Su nombre proviene del efecto que ejerce sobre las células de la pituitaria, ya que incrementa los niveles de AMP cíclico (AMPC) y causa la liberación de diferentes hormonas hipofisiarias. Como este péptido tiene una amplia distribución anatómica y participa en diversas funciones cerebrales, se despertó el interés de varios grupos de investigación por estudiar los efectos farmacológicos y las funciones biológicas en las que el PACAP participa. En esta revisión se presenta la información más reciente de las múltiples acciones fisiológicas que tiene el PACAP y sus receptores en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en otros sistemas.

El PACAP es un péptido de 38 aminoácidos, aislado de extractos de hipotálamo de oveja. El PACAP es miembro de la superfamilia secretina/hormona de crecimiento/glucagon/péptido intestinal vaso activo, y su secuencia es la más conservada filogenéticamente. Existen dos formas biológicamente activas del PACAP: una de 38 aminoácidos y otra truncada de 27; los dos péptidos están amidados en su extremo carboxilo terminal. El PACAP comparte una gran homología estructural con todos los péptidos pertenecientes a esta familia, principalmente con el péptido intestinal vasoactivo (VIP) de porcino, con el que muestra 68% de homología en su porción aminoterminal 1-28. La clonación molecular del ADN complementario (cDNA) del precursor del PACAP-38 de rata, ratón, bovino y humano, mostró que la secuencia de aminoácidos es 100% idéntica entre ellos. La secuencia del PACAP se identificó en diferentes especies de vertebrados y de algunos invertebrados, como los tunicados, y en anélidos. El PACAP de estas especies muestra un alto grado de identidad con el PACAP del humano con una diferencia de uno a cuatro aminoácidos. Este patrón de conservación en la secuencia de aminoácidos en las diferentes especies animales muestra la importancia biológica de este neuropéptido. Entre las funciones más relevantes del PACAP están las de ser un factor hipofisiotrófico y un neuromodulador. Los receptores para el PACAP pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas Gs que tienen siete asas transmembranales. El PACAP produce sus efectos biológicos al unirse con al menos tres tipos de receptores: los PAC-1, VPAC1 y VPAC2. El receptor PAC-1 tiene más afinidad de unión con el PACAP-38 ($K_d=0.5$ nM) y el PACAP-27 ($K_d=2.0$ nM). Los estudios de la distribución anatómica de los mRNA que codifican para el PACAP y sus receptores demuestran que se expresan desde las primeras etapas embrionarias en el ratón. El PACAP se distribuye ampliamente en el Sistema Nervioso Central, en el Sistema Nervioso Periférico y en las gónadas. En el SNC de la rata adulta se encontraron células y fibras inmunorreactivas a PACAP-38 y PACAP-27, distribuidas en la corteza cerebelar, hipocampo, septum, tálamo, núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, eminencia media, tallo cerebral y médula espinal. En testículos de rata y ratón se encontró una alta concentración de

PACAP. Otros tejidos y órganos con células y fibras positivas a PACAP son las glándulas hipófisis, adrenales, pineal y salivales, así como el tracto gastrointestinal, el páncreas, la retina, y algunos ganglios simpáticos. El PACAP cumple con los criterios para considerarlo un factor hipofisiotrófico, ya que está presente en neuronas hipotalámicas que proyectan al sistema portahipofisiario. Asimismo, en la sangre portahipofisiaria interactúa con receptores específicos localizados en las células de la hipófisis y los regula.

Palabras clave: PACAP-38, superfamilia VIP/GH/Secretina/Glucagon, factores hipofisiotróficos, neuroendocrinología.

INTRODUCCIÓN

Después del descubrimiento de los factores hipotalámicos hipofisiotróficos como el factor liberador de la hormona tirotrófica (TRH) (12), luteinizante (LHRH) (80), de la hormona del crecimiento (GHRH) (41) y de la corticotrofina (CRH) (141), se caracterizaron otros factores liberadores, como el factor de la hormona folículo estimulante (FSHRH) (79) y el de la hormona prolactina (PRL) (56, 93, 138). Sin embargo, algunos estudios mostraron que en la adenohipófisis había otros tipos celulares que no se estimulaban con los factores ya conocidos. Lo anterior llevó a pensar que había algún otro factor hipofisiotrófico. El grupo de Miyata (83) aisló de extractos crudos de hipotálamo de oveja un nuevo péptido de 38 aminoácidos, al que llamó polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP). Se le dio este nombre por su capacidad para incrementar los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y causar la liberación de diferentes hormonas hipofisiarias, como la prolactina, la hormona del crecimiento, la adrenocorticotrófica y la luteinizante, en experimentos de cultivos celulares de pituitaria de rata. La capacidad del PACAP para estimular el AMPC fue 1000 veces más potente que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (5, 7, 83, 84). El PACAP tiene una distribución anatómica amplia en el Sistema Nervioso Central (SNC) y se sintetiza en diferentes núcleos cerebrales, principalmente en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Las neuronas que contienen PACAP mandan sus terminales por la eminencia media y terminan en la vecindad de los capilares del sistema portahipofisiario. También se sintetiza en células de varios tejidos y órganos. Se conocen tres grupos de receptores a los que se une el PACAP, los cuales tienen una distribución amplia en el cerebro. Se ha reportado que el PACAP regula importantes funciones biológicas en los vertebrados. Entre las funciones más relevantes del PACAP están las de ser un factor hipofisiotrófico, es decir, una molécula que promueve la liberación de hormonas hipofisiarias, y un neuromodulador. Además produce

vasodilatación, broncodilatación y activación de la motilidad intestinal; incrementa la secreción de insulina e histamina, y estimula la multiplicación y diferenciación celular. En esta revisión se presenta la información más reciente sobre las funciones del PACAP y sus receptores en el Sistema Nervioso Central y en otros sistemas. La amplia distribución anatómica de este neuropéptido y de sus receptores ha despertado el interés de diferentes grupos de investigación por estudiar los efectos farmacológicos y las funciones biológicas en las que participa.

Estructura del PACAP

El PACAP es miembro de la superfamilia compuesta por la secretina, la hormona del crecimiento (GH), el glucagon y el péptido intestinal vasoactivo, ya que entre ellos comparten los primeros 27 aminoácidos de la región aminoterminal. El PACAP es el más conservado filogenéticamente. Guarda una gran homología estructural con todos los péptidos pertenecientes a esta familia, principalmente con el VIP de porcino, con el que tiene 68% de homología en su porción aminoterminal 1-28 (7). Existen dos formas biológicamente activas del PACAP: una de 38 aminoácidos y otra de 27. Los dos péptidos están amidados en su extremo carboxilo terminal. Las secuencias de aminoácidos del PACAP-38 y el PACAP-27 son, respectivamente: **H-S-D-G-I-F-T-D-S-Y-S-R-Y-R-K-Q-M-A-V-K-K-Y-L-A-A-V-L-G-K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K-NH₂** y **H-S-D-G-I-F-T-D-S-Y-S-R-Y-R-K-Q-M-A-V-K-K-Y-L-A-A-V-L-NH₂**. La secuencia peptídica del PACAP se identificó en diferentes especies de vertebrados, como el humano (54, 55, 102), el borrego (64, 83, 84), la rata (100), el ratón (104), el pollo (82), parcialmente en lagartijas (110), ranas (22), peces (1, 60) y en algunos invertebrados como los tunicados y más recientemente en anélidos (113, 132). En la mayoría de estas especies existe un alto grado de identidad con el PACAP del humano, sólo difieren por entre uno a cuatro aminoácidos. La estructura tridimensional del PACAP es similar a la de los péptidos de la superfamilia secretina/GH/glucagon/VIP, en particular a la del VIP (56, 57). Ambos tienen dos α -hélices separadas por una región no helicoidal. Sin embargo, en el caso del PACAP-27, la primera α -hélice tiene dos aminoácidos diferentes hacia la región C-terminal, y la conformación de la segunda α -hélice está más plegada que la del VIP. Esta diferencia conformacional entre el VIP y el PACAP-27 contribuye a la especificidad para sus receptores (56, 57). El patrón de conservación en la secuencia de aminoácidos del PACAP en los diferentes animales de la escala filogenética muestra la importancia biológica de este neuropéptido (87, 144).

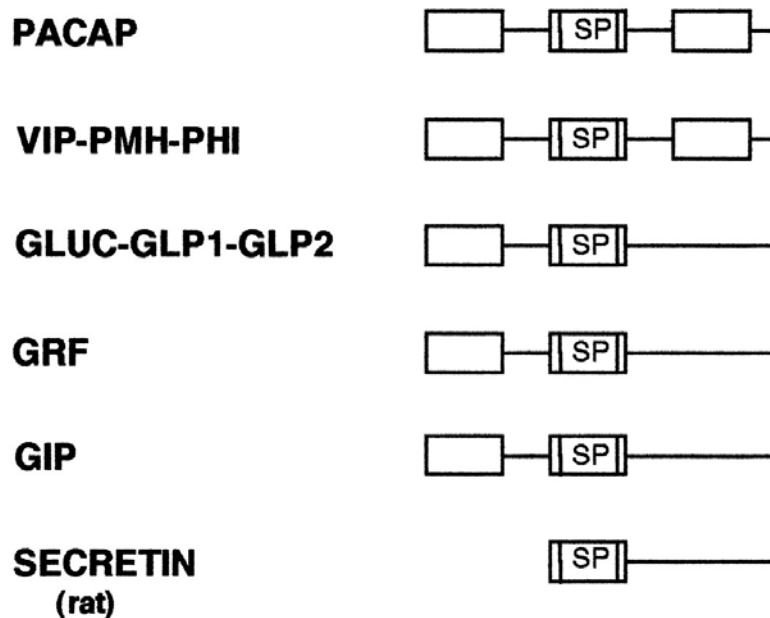


Fig. 1. Comparación esquemática del gen del PACAP-38 con los genes de la superfamilia secretina/GH/glucagon/VIP (todos los genes son de humano, excepto el de secretina, que es de rata). Los exones se muestran en cajas y los intrones en líneas. SP, péptido señal; VIP, péptido intestinal vasoactivo; PMH, péptido histidina metionina; PHI, péptido histidina isoleucina; Gluc, glucagon; GLP1; péptido parecido a glucagon 2; GRF, factor liberador de la hormona de crecimiento; GIP polipéptido insulínico dependiente; SECR, secretina (modificado de Sherwood y cols., 2000).

Clonación y precursor del PACAP

El grupo de Hosoya (54) clonó el gen del PACAP del humano que se encuentra en la región P11 del cromosoma 18, el cual está formado de cinco exones y cuatro intrones. El exón 1 codifica una proteína críptica; el exón 2, el péptido señal; el exón 3, una proteína espaciadora sin función aparente; el exón 4 codifica un péptido denominado PRP, del que no se sabe todavía su función biológica, y el exón 5 codifica el PACAP-38. La región promotora del gen posee aproximadamente 400 pares de bases (102). En este gen se encuentran dos sitios CREB (*cAMP-response-element*), donde se une el AMPc para regular la velocidad de transcripción. Los trabajos de Suzuki y colaboradores (134) y de Hasimoto y colaboradores (49), muestran que el PACAP se sintetiza constitutivamente y que la transcripción del gen del PACAP se incrementa por la acción del AMPc, por el 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato y por el PACAP mismo. Debido a las evidencias filogenéticas, se sugiere que el gen del PACAP se originó de la duplicación de un gen ancestral común de la superfamilia secretina/GH/glucagon/VIP (19). Por esto, la organización general del gen del PACAP tiene gran similitud con la del VIP y con los demás miembros de esta superfamilia (144) (figura 1).

La clonación molecular del cDNA del precursor del PACAP-38, el prepro-PACAP de la rata, el ratón, de

bovino y humano, mostró que los aminoácidos deducidos son 100% idénticos entre ellos, el cDNA codifica para un precursor de 176 aminoácidos; en éste, se encuentra una secuencia de 24 aminoácidos que corresponden al péptido señal en la región N-terminal y el PACAP-38 en el extremo C-terminal (54, 64, 100, 101, 104, 105).

Procesamiento del prepro-PACAP

El precursor del PACAP en estas tres especies contiene sólo una secuencia que codifica para el PACAP-38. Este precursor tiene siete sitios con aminoácidos básicos para el rompimiento enzimático, donde actúan las enzimas convertasas de prohormonas PC1, PC2, PC4, PC5, PC7 y PACE4 (9, 74, 75, 123), que originan al PACAP-38 y al PACAP-27, en mayor o menor cantidad, dependiendo del tejido donde se sintetizan. Por ejemplo, en el hipotálamo de la rata, abundan las enzimas PC1 y PC2. Los experimentos de cotransfección en células GH4C1 confirmaron que las dos enzimas procesan el precursor y generan con mayor abundancia el PACAP-38 (80ng) que el PACAP-27 (76). En el testículo, donde el PACAP-27 es abundante, la enzima PC4 procesa el precursor y genera ambos péptidos (75). Los dos péptidos son posteriormente amidados en su extremo carboxilo terminal. El residuo de Gly¹⁶⁹ es el sitio de reconocimiento

CUADRO 1
Receptores VIP/PACAP

Receptor	Isoformas	Distribución anatómica	Funciones	Agonistas	Antagonistas
PAC1-R	PAC1-R-s PAC1-R-vs PAC1-R-hop1 PAC1-R-hop2 PAC1-R-hiphop1 PAC1-R-hiphop2 PAC1-R-hip PAC1-R-TM4	Corteza cerebral, hipocampo, tálamo, cerebelo, retina, núcleo supraquiasmático, núcleos paraventricular y supraóptico hipotalámicos, hipotálamo lateral, fibras en la hipófisis posterior, gónadas	Incrementa la actividad de la adenilato ciclasa, incremento de la entrada de Ca ⁺⁺ , modulación de la neurotransmisión, inmunomodulación	Maxalidan	M65 (derivado de Maxalidan) PACAP 6-38
VPAC1-R	No identificadas	Corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio, glándula pineal, cerebelo	Regulación de ciclos circadianos; reacción al daño nervioso, neurotransmisión del dolor, inmunomodulación	[Lys ¹⁵ , Arg ¹⁶ , Leu ²⁷] VIP(1-7) GRF(8-27)-NH ₂	[Ac-His ¹ , D-Phe ² , Lys ¹⁵ , Arg ¹⁶] VIP(3-7) GRF (8-27)-NH ₂
VPAC2-R	No identificadas	Hipocampo, bulbo olfatorio, tálamo, núcleo, amígdala, giro dentado supraquiasmático, núcleo, médula espinal, ganglios de la raíz dorsal, páncreas, músculo esquelético, riñones, tejido adiposo, testículo y estómago	Regulación de ciclos circadianos; reacción al daño nervioso, neuromodulación y neurotransmisión del dolor	Ro251553;	PG9946 Ro251392

(Cuadro modificado de Shioda y Waschek, 2002.)

de la enzima monooxigenasa α -amidante del sustrato peptidil glicina (PAM), que sustituye a la glicina por un grupo amida y queda unido a la Lys¹⁶⁸ del extremo carboxilo terminal del PACAP-38. Finalmente, con el mismo mecanismo se corta el tripéptido Gly¹⁵⁸-Lys¹⁵⁹-Arg¹⁶⁰ para obtener la forma amida del PACAP-27 (27, 104).

Receptores

Diferentes grupos de investigación clonaron los receptores para el PACAP y sus isoformas (50, 51, 55, 90, 109) (cuadro 1). Los receptores para el PACAP pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas Gs, que tienen siete dominios transmembranales (figura 2). Se conocen el PAC-1, el VPAC1 y el VPAC2. El receptor PAC-1 tiene mayor afinidad de unión para el PACAP-38 (Kd 0.5 nM) que para el PACAP-27 (Kd 2.0 nM) (8, 17).

Existen diez isoformas del receptor PAC-1. Seis de estos receptores difieren por la ausencia o presencia de dos secuencias consenso (*cassette*), nombradas “hip” y “hop”, que se insertan al final de la tercera asa intracelular del receptor (Spengler y cols., 1993). Las variantes se nombran PAC1-R-s (receptor sin *cassette*, forma corta), PAC1-R-hip, PAC1-R-hop1, PAC1-R-hop2, PAC1-R-hiphop1, PAC1-R-hiphop2 (cuadro 1). Tanto la forma corta como las variantes hop activan

potencialmente la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC) en células transfectadas; la variante hip no activa la PLC (figura 2). Una característica importante del receptor PAC-1 y de sus isoformas es que no unen al VIP (8, 17). Los otros dos receptores para el PACAP también están acoplados a proteínas Gs y son el VPAC1 y el VPAC2. Estos receptores tienen una afinidad aproximadamente igual para el PACAP y para el VIP (1 nM) y no se han descrito isoformas para estos receptores (8, 17).

Distribución anatómica del PACAP

El PACAP se distribuye ampliamente en el Sistema Nervioso y en algunas glándulas y órganos. La distribución anatómica de los mRNA que codifican el PACAP-38 y los receptores se expresa desde los nueve días de la etapa embrionaria del ratón y se incrementa en número después de los primeros días postnatales (126, 129). En los estudios realizados en el SNC de la rata adulta se encontraron neuronas inmunorreactivas (NIR) y fibras inmunorreactivas (FIR) a PACAP-38 y PACAP-27, con una distribución amplia en la corteza cerebelar, hipocampo, septum, tálamo, hipotálamo, eminencia media, tallo cerebral y médula espinal (6, 10, 11, 72, 85, 86). Existe una alta concentración de PACAP en los núcleos hipotalámicos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN), en el núcleo habenular,

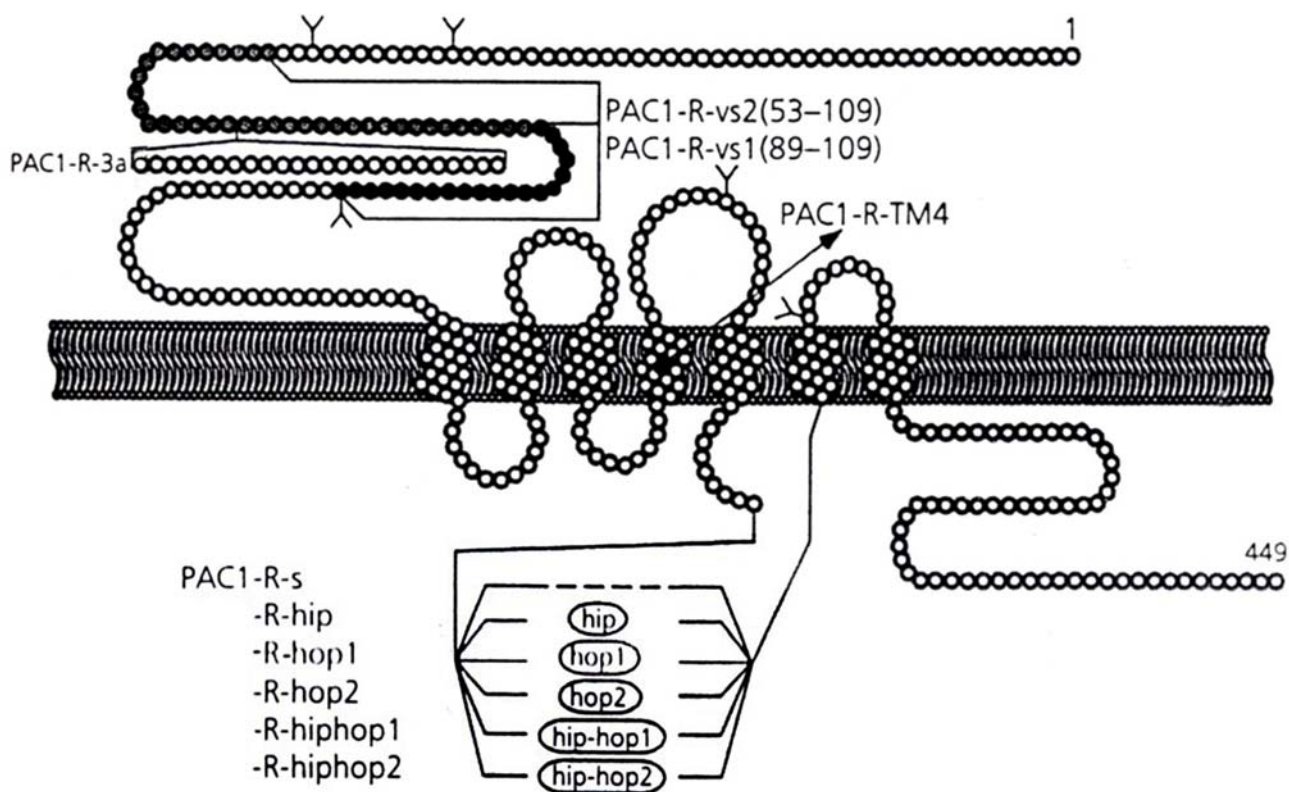


Fig. 2. Esquema del receptor PAC-1 con sus diez isoformas. Este receptor pertenece a la familia de los receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas Gs. Se indica el sitio en donde difieren los aminoácidos que dan lugar a las diferentes isoformas del PAC-1 (modificado de Shioda y Waschek, 2002).

en el tallo cerebral, especialmente en el núcleo pontino, en el parabraquial lateral y en el complejo vagal (144), así como en los núcleos olfatorios, en células de Purkinje del cerebelo, en los cuerpos celulares de las neuronas columnares intermediolaterales de la médula espinal, en los núcleos vestibular y coclear, en el complejo amigdalóide, núcleo talámico paraventricular, en el pretectum, parabraquial, trigeminal sensorial y tracto solitario (144). El radioinmunoensayo (RIA) de extractos crudos de cerebro de rata, mostró que las concentraciones más altas de PACAP-38 se encuentran en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y en la eminencia media en el rango de 120-130 pmol/g y del PACAP 27 de 12-15 pmol/g (6, 34). En el hipotálamo del humano, el contenido de PACAP 38 fue de sólo 7-9 pmol/g (135). La mayor concentración de PACAP, fuera del SNC, está en el testículo de la rata y el ratón (46, 52). Otros tejidos y órganos que presentan células y fibras IR (NIR Y FIR) a PACAP son el tracto gastrointestinal, el páncreas, la retina, algunos ganglios simpáticos y en las glándulas: hipófisis anterior y posterior, adrenales, pineal y salivales (47, 86, 124).

El PACAP como factor hipofisiotrófico

El grupo de Miyata (83) aisló el PACAP del hipotálamo de oveja y probó su efecto en cultivos de células de la hipófisis. Estos experimentos mostraron que dosis mínimas de PACAP (10^{-10} M y 10^{-9} M) incrementaban la liberación de la hormona del crecimiento, de la prolactina, de la corticotropina y de la hormona luteinizante, lo que confirmó que este nuevo péptido cumple con los criterios para ser un factor hipofisiotrófico. Estos son: a) debe estar presente en neuronas hipotalámicas que proyectan al sistema porta-hipofisiario, b) debe estar presente en la sangre porta-hipofisiaria, c) debe ser capaz de interactuar con receptores específicos localizados en las células de la hipófisis, y d) debe tener la capacidad de regular la función de las células de la hipófisis anterior (112). Existe inmunorreactividad al PACAP en neuronas hipotalámicas del humano, la oveja, el pollo, la rata, la rana y algunos peces. En el humano y la rata, las áreas con mayor IR son los núcleos hipotalámicos, paraventricular, supraóptico, núcleo arcuato y área preóptica; estos núcleos proyectan sus axones hacia la eminencia media (45, 144). También se encontraron

FIR para el PACAP en la eminencia media y a lo largo de los capilares del sistema portahipofisiario, así como presencia de PACAP en la sangre portal de diferentes vertebrados (25, 70, 112). Los estudios de hibridación *in situ* del mRNA que codifica al PACAP revelan que no se sintetiza en la hipófisis anterior. La IR encontrada en esta glándula parece ser más bien el resultado del transporte por vía axonal desde las neuronas hipotalámicas, así como de la sangre misma del sistema portal. En cambio, el receptor PAC-1 se sintetiza con abundancia en la hipófisis anterior y posterior (cuadro 1) (38, 59).

El PACAP y la prolactina

La prolactina estimula la secreción de leche y el crecimiento de las glándulas mamarias. Coleman y Bancroft (24) reportaron que el PACAP-38 estimula la expresión del gen de la PRL en la línea celular GH2 de la hipófisis anterior de la rata; esta activación del gen de la PRL está mediado por la activación de proteínas cinasas, dependiente de AMPc. Los estudios recientes sugieren que las GTPasas Rap1 y Ras intervienen también en la expresión del gen de la PRL, así como en la cascada de señalización de las proteínas MAPquinas que actúan en el nivel del promotor del gen de la PRL (117). Existe una controversia sobre el efecto que tiene el PACAP sobre la liberación de prolactina, pues parece depender del modelo experimental que se use, ya que algunos investigadores reportan la acción liberadora que tiene sobre esta hormona, mientras que otros se refieren a la inhibición de la liberación de prolactina. Miyata y colaboradores (83) reportaron la liberación de PRL en cultivos celulares de hipófisis. Tohei y colaboradores (139) demostraron que la inyección intracerebroventricular (i.c.v.) del antagonista (PACAP6-38) inhibió la liberación de PRL estimulada por la succión del pezón en ratas lactantes. Estos resultados sugieren que el PACAP endógeno puede actuar como un neuromodulador dentro del hipotálamo y que participa en la secreción de PRL en ratas lactantes. Sin embargo, la administración del PACAP-38 sintético (0.1-10 nM) inhibe la liberación de PRL de manera dosis dependiente. La inyección i.c.v. de PACAP (10 nmol) incrementa los metabolitos de la dopamina y el ácido 3-4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) en el hipotálamo medial basal de ovejas, e inhibe la liberación de PRL (2, 3). En ovejas ovariectomizadas, la infusión de PACAP (0.1 nmol) en el núcleo arcuato del hipotálamo reduce la concentración plasmática de PRL (2). Hasta la fecha, las evidencias son ambiguas y no es claro el mecanismo de acción del PACAP sobre la liberación de PRL. Para explicar el papel del PACAP en la inhibición o estimulación de la liberación de PRL, se propone que el primero puede incrementar la secre-

ción de factores paracrinos que participan en la liberación de PRL como el VIP, la vasopresina y la interleucina IL-6 (92, 139). Se sabe también que el PACAP inhibe la enzima piroglutamil peptidasa II; esta enzima inactiva la TRH (hormona liberadora de tirotropina), que también promueve la liberación de PRL (142).

El PACAP y las gonadotropinas LH y FSH

Las hormonas LH y FSH participan en la maduración del folículo ovárico y de los espermatozoides, así como en la secreción de hormonas esteroides. El PACAP actúa en las células gonadotróficas estimulando la síntesis y liberación de LH y FSH. La exposición continua de PACAP a concentraciones fisiológicas, aplicado a cultivo de células hipofisiarias de rata, promueve la liberación de LH y FSH (77, 83). El receptor PAC-1 se expresa en el núcleo arcuato del hipotálamo de rata (150). Utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje, se encontró que el PACAP se colocaliza parcialmente en las células gonadotróficas que sintetizan LH y FSH, lo que permite suponer que existe una regulación paracrina o autocrina de las funciones del lóbulo anterior hipofisiario (69, 108). El PACAP eleva la expresión génica de las subunidades alfa y beta de FSH y LH y actúa directamente en gonadotropos; esta acción estimuladora es mediada por las proteínas cinasa C y cinasa A (PKC y PKA) (43, 44).

El PACAP, la vasopresina y la oxitocina

Las células magnocelulares neuroendocrinas (MNCs) del SON y del PVN producen vasopresina (VP) y oxitocina, y las liberan al sistema portahipofisiario, así como intranuclearmente, en respuesta a la deshidratación y a otros estímulos. Estas hormonas actúan sobre el riñón y otros blancos para regular el equilibrio hidroelectrolítico, la lactancia y la función cardiovascular. La oxitocina actúa estimulando la contractilidad uterina durante el parto y facilita la salida de la leche como respuesta a la succión. La vasopresina tiene una acción antidiurética, favoreciendo la reabsorción de agua y electrolitos a través de las nefronas. La liberación está regulada por la actividad eléctrica de las neuronas magnocelulares del SON y el PVN hipotalámicos, y están bajo el control de una gran variedad de neurotransmisores y neuromoduladores; entre ellos, el PACAP.

El PACAP estimula la liberación somatodendrítica de la oxitocina y de la vasopresina (23, 35, 56, 59, 83). Recientemente se demostró que el receptor PAC-1 es el principal responsable del incremento en las concentraciones de Ca^{++} intracelular en la región somatodendrítica de las neuronas del SON y que pro-

duce la secreción de vasopresina y oxitocina (56, 59). El grupo de Nomura (96) observó que aumenta la expresión de los genes c-Fos en el PVN y en el SON después de 30min de la administración i.c.v. de PACAP en una relación dosis dependiente. También se incrementó significativamente el RNA heteronuclear de vasopresina en los mismos núcleos 30min después de la inyección i.c.v. de PACAP (200 pmol/rata), lo que sugiere que éste activa las neuronas de dichos núcleos al unirse a sus receptores y que activa paralelamente la transcripción de los genes para vasopresina (96).

En una colaboración entre el grupo de la doctora Currás-Collazo y nuestro grupo, estudiamos el efecto del PACAP sobre la liberación de vasopresina, glutamato y aspartato en explantes de SON. Reportamos que la aplicación de PACAP (de 0.1 μ M a 1.0 μ M) incrementa la liberación de vasopresina de dos a nueve veces sobre la liberación basal, cuantificado mediante análisis de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (35). También demostramos que la inmunorreactividad (IR) al neuropéptido PACAP y al receptor PAC-1 se incrementa en neuronas y fibras del PVN y del SON en ratas deshidratadas, lo que sugiere que el péptido y su receptor participan en la homeostasis hídrica (73). Por otro lado, el efecto del PACAP en la liberación de VP del compartimiento somatodendrítico parece depender de VP vía autorreceptores, lo que permite una regulación fina de la liberación, sobre todo en situaciones de una prolongada activación, como la deshidratación (36).

El PACAP y la proopiomelanocortina

El grupo de Kimura (65) demostró que existe inmunorreactividad a PACAP y al receptor PAC-1 en células del lóbulo intermedio y fibras en el lóbulo neural de la hipófisis por medio de microscopía electrónica (65, 136). En el lóbulo intermedio de la hipófisis se encuentran los melanotopos, que sintetizan la proopiomelanocortina (POMC), precursor de la ACTH, α -MSH y de la β -endorfina. El PACAP actúa en los melanotopos aumentando la expresión génica de la POMC (4, 13, 14, 61, 66, 114) y traduce su señal a través de las vías del AMPc y fostato de inositol (136). Los experimentos realizados en cultivos de células hipofisiarias mostraron que el PACAP estimula de manera dosis-dependiente la secreción de α -MSH y ACTH, con concentraciones de 1nM (EC_{50}) (66). El PACAP-27 y el PACAP-38 se unen a sus receptores en los corticotropos de la hipófisis anterior y estimulan la liberación de ACTH (97). No se sabe si el PACAP ejerce alguna función liberadora sobre la β -endorfina, que es un péptido opioide y otros péptidos derivados de la POMC. El PACAP estimula también la expre-

sión génica de la proencefalina, el precursor de la Leu- y Met-encefalina, en cultivos de células neocorticales (61). Sin embargo, no se ha estudiado el efecto del PACAP sobre la liberación de los péptidos opioides.

El PACAP y otros neurotransmisores y neuromoduladores

El PACAP se colocaliza con diferentes neurotransmisores y/o neuromoduladores, modulando su liberación o interactuando en conjunto para regular alguna función. Entre los más estudiados están las catecolaminas, la melatonina, la histamina, la serotonina y el óxido nítrico.

Catecolaminas y corticoesteroides

El PACAP modula las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y está presente en las glándulas suprarrenales de los mamíferos, principalmente en la médula (6, 34). También el PAC-1 se encontró en las células cromafines de la médula suprarrenal de la rata y la rana mediante técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (85, 152). Lamouche y colaboradores (71) analizaron *in vivo* las concentraciones de epinefrina y norepinefrina plasmática en perros, a los que se les administró PACAP 27 (50 ng), y encontraron un incremento en la secreción de estas catecolaminas mediante HPLC (71, 151). Otros grupos reportaron un incremento en los niveles de catecolaminas en cultivos de células cromafines (42) o en la solución de incubación (perfusados) de glándulas suprarrenales completas de bovino (98, 137), cerdo (58) y rata (31, 32, 147, 148). Uno de los mecanismos propuestos es que el PACAP activa los canales de Ca^{2+} tipo L, se incrementa la entrada de Ca^{2+} y como consecuencia existe una mayor liberación de catecolaminas (31, 32, 33). También incrementa la secreción de la aldosterona, el mineralocorticoide que regula el balance electrolítico; las evidencias muestran que mediante un mecanismo paracrino estimula las células de la corteza suprarrenal (81, 95, 111, 152). El PACAP aumenta los niveles de cortisol (26, 63). El cortisol, una de las principales hormonas que se liberan en situaciones de estrés, eleva la frecuencia cardíaca, la presión arterial y el flujo sanguíneo, y moviliza los carbohidratos para mejorar el tono cardiovascular (133). Cuando se agrega PACAP 27 (1-10 pmol/kg) a la dieta de perros experimentales, se incrementan los niveles de cortisol plasmático (63). También se observó un incremento de la secreción de cortisol en las glándulas suprarrenales aisladas de cerdo (63). Estos hallazgos identifican al PACAP como un posible neuromodulador de las glándulas suprarrenales de diferentes especies animales y apoyan la hipótesis de que es un importante modulador de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Melatonina

Por medio de los experimentos de degeneración nerviosa se demostró que la glándula pineal está inervada por fibras que se originan del ganglio trigémino y que contienen PACAP, lo que permitió suponer que este péptido regula la síntesis y/o secreción de la melatonina (78). Simonneaux y colaboradores (131) y otros grupos, reportaron recientemente que en los cultivos de pinealocitos de rata y de pollo perfundidos con PACAP (1-100 nM) se estimula la secreción de melatonina (94, 121). También se reportó que la perfusión de cultivos de pinealocitos de rata y de pollo con PACAP promueve un incremento en la actividad de dos enzimas necesarias en la vía biosintética de la melatonina, la serotonina-*N*-acetiltransferasa (153) y la hidroxindol-*O*-metiltransferasa (115). Estos datos sugieren que el PACAP participa en la regulación de la producción rítmica de la melatonina.

Histamina

Cuando se cultivan mastocitos de peritoneo de rata en presencia de PACAP (1-10 nM), se estimula la secreción de histamina (88, 119, 120). El PACAP se localiza en algunas de las neuronas de la dermis del humano. Cuando se inyecta intradérmicamente PACAP 38 (3-10 µM) en muestras de piel intacta, aumenta la liberación de histamina medida mediante microdiálisis, lo que sugiere que el PACAP puede intervenir en la regulación de los procesos inflamatorios (99).

Serotonina

Seebeck y colaboradores (122) reportaron que el PACAP 27 (2 µM) estimula moderadamente la secreción de serotonina en los cultivos de mastocitos de peritoneo de rata; el fragmento PACAP 6-27 lo hace con más potencia. El grupo de Fujimiya (29, 30), al administrar *in vivo* PACAP en el duodeno de rata, observó una reducción de la liberación de serotonina en el lumen y no afecta la liberación vascular; lo anterior sugiere que el PACAP tiene una acción directa en las células enterocromafines del lumen doudenal. También observaron que, al aplicar el inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (NG-nitro-L-arginina), se antagonizó el efecto inhibitorio del PACAP, lo que sugiere que el óxido nítrico es necesario para que el PACAP ejerza su acción inhibitoria sobre la liberación de serotonina de las células enterocromafines del lumen intestinal (29, 30).

Oxido nítrico

El PACAP se encuentra en neuronas que producen óxido nítrico (NO) de diferentes núcleos cerebrales; por ejemplo, en los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) del hipotálamo (103, 140). El

PACAP y el NO parecen modular las funciones osmorregulatorias de las neuronas magnocelulares del SON y PVN. Como se mencionó anteriormente, nuestro grupo observó un aumento en la inmunorreactividad al PACAP, al receptor PAC-1 y a la enzima sintetasa del óxido nítrico en los núcleos SON y PVN en ratas sometidas a deshidratación. Lo anterior sugiere la participación del PACAP y del óxido nítrico en el mantenimiento de la homeostasis hídrica (73, 91). En el músculo liso del intestino proximal del pez *Gadus morhua*, el PACAP inhibe las contracciones espontáneas, al igual que el óxido nítrico y el nitroprusiato de sodio. Sin embargo, no se encontró alguna interacción entre el PACAP y el NO, lo que sugiere que actúan usando distintas vías de señalización para controlar la motilidad intestinal de este pez (106). En cultivos celulares, el PACAP 38 y el 27 (10⁻⁷ M/30min) disminuyen la producción de NO de manera dosis-dependiente en los cultivos de células PC12, probablemente por la fosforilación de la enzima óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS), por las PKC que se activan en la cascada de señalización del AMPc. Los autores sugieren un papel regulador del PACAP en la actividad de la nNOS a través del receptor PAC-1 en las células PC12 (107).

La activación de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) por citocinas inflamatorias se considera como un mediador en la destrucción de las células beta pancreáticas, con la consecuente producción de diabetes tipo I. Hallazgos recientes muestran que el PACAP inhibe la producción de NO en macrófagos activados por citocinas y en la línea celular BTC derivada de células beta pancreáticas. La exposición a tres diferentes citocinas, IL-1β, IFN-γ y TNFα, produce una reducción de la viabilidad celular y la expresión del RNAm de la iNOS. La administración de PACAP 38 (10nM) inhibe significativamente la producción de NO (50% durante 12h) y aumenta la viabilidad del cultivo celular. Lo anterior sugiere que el PACAP actúa como un citoprotector en los cultivos de células BTC por la inhibición de la iNOS (125).

Efectos del PACAP en las gónadas

El PACAP ejerce una regulación local de la actividad de las gónadas masculinas y femeninas. El RNAm del PACAP y el receptor PAC-1 se encuentran en células germinales del testículo de la rata (78, 109, 127). Algunas evidencias demuestran que el PACAP induce la secreción de hormonas gonadales. Estimula la liberación de la testosterona de manera dosis-dependiente en células de Leydig de rata *in vitro* (28, 116, 118) y activa la síntesis de las proteínas secretadas por las células germinales GSP1, GSP2, GSP3 (*germ cell-secreted proteins*) y de las proteínas que se unen a la fosfatidil-etanolamina

(PEBP: *phosphatidylethanol-amine-binding protein*) en los espermátocitos primarios, mientras que en las espermátides inhibe la síntesis de estas proteínas (149). El PACAP activa la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (PLC) en las células de Leydig al interactuar con el receptor PAC-1 (116). En el ovario de la rata se identificaron los RNAm del PACAP y de su receptor, específicamente en las células de la zona granulosa y lútea (39, 62, 67, 68). La mayoría de las células de la granulosa de los folículos preovulatorios tiene inmunorreactividad para el PACAP (39). El PACAP (10^{-10} a 10^{-11} M) ejerce una estimulación dosis-dependiente en la secreción de estradiol y progesterona en cultivos de células de la granulosa de ovario de rata (39, 40, 53, 154), y en este nivel parece ser más potente que la LH en la estimulación del AMPc (53). Estos estudios y la presencia del receptor PAC-1 en las células de la granulosa sugieren que el PACAP puede ser un regulador autocrino o paracrino de la función ovárica.

El PACAP como factor neurotrófico y neuroprotector

Existen reportes que proponen que el PACAP es un factor neurotrófico y neuroprotector (15, 16, 18, 20, 21, 37, 143, 145, 146). La presencia de una concentración elevada del mRNA que codifica al PACAP y sus receptores desde las primeras etapas embrionarias en el ratón (126, 129) sugiere que el PACAP puede ejercer funciones importantes durante la ontogénesis del SNC. El PACAP neutraliza los efectos neurotóxicos de la 6-hidroxidopamina, la cual induce muerte celular en las neuronas dopaminérgicas; esto se demostró con cultivos de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de embriones de ratas. La ceramida-C2 es una proteína que activa la caspasa 3 en el proceso de apoptosis, y se observó que se inhibe la apoptosis significativamente en cultivos de neuronas de la capa granular del cerebelo, en presencia de ceramida-C2 más PACAP en concentraciones dosis dependiente (48, 143); además promueve el crecimiento de neuritas (37).

El PACAP (1 mM) actúa como neuroprotector de los efectos citotóxicos del glutamato en cultivos de neuronas corticales (89) y en cultivos de células PC12 (107). También se reportó el efecto neuroprotector del PACAP a la neurotoxicidad inducida por glutamato en cultivos de neuronas de la retina (128, 130), donde intervienen los mecanismos de señalización de las PKA y MAP cinasas. Lo anterior sugiere que la disminución de la neurotoxicidad está mediada por las MAP cinasas activadas indirectamente por el AMPc. Este conjunto de evidencias sugiere que, durante el desarrollo, el PACAP actúa como un factor neurotrófico mientras que, en el cerebro adulto, el PACAP parece funcionar como un agente neuroprotector (8).

Conclusiones

Con el descubrimiento del PACAP, numerosos grupos de investigación estudian la participación de este polipéptido en las diferentes funciones biológicas y tratan de dilucidar sus mecanismos de acción. Esto permite un mejor conocimiento de las funciones en que participa el PACAP, como la regulación de la liberación de hormonas y neurotransmisores, la regulación de diferentes sistemas, como el cardiovascular e inmune, y en el equilibrio hidro-electrolítico, así como su papel como neuroprotector en patologías tan importantes como la diabetes tipo I y la deshidratación. Todavía falta mucho por aprender acerca de este polipéptido, por lo que se abren nuevas líneas de investigación para completar su conocimiento dentro de las funciones biológicas y su importancia en la medicina y en la salud.

Agradecimientos:

Al UC-MEXUS-CONACYT MLO/MCC por haber financiado parcialmente este trabajo. A la Dirección General de Estudios Profesionales (DGEPE) de la UNAM (Beca Doctorado a SMR).

REFERENCIAS

1. ADAMS BA, LESCHIED DW, VICKERS ED, CRIM LW, SHERWOOD NM: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in sturgeon, whitefish, grayling, flounder and halibut: cDNA sequence, exon skipping and evolution. *Regul Pept*, 15:27-37, 2002.
2. ANDERSON ST, CURLEWIS JD: PACAP stimulates dopamine neuronal activity in the medial basal hypothalamus and inhibits prolactin. *Brain Res*, 790(1-P2):343-6, 1998.
3. ANDERSON ST, SAWANGJAROEN K, CURLEWIS JD: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide acts within the medial basal hypothalamus to inhibit prolactin and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 137(8):3424-9, 1996.
4. AOKI Y, IWASAKI Y, KATAHIRA M, OISO Y, SAITO H: Regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. II: Effects of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide. *Endocrinology*, 138(5):1930-4, 1997.
5. ARIMURA A, SHIODA S: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front Neuroendocrinol*, 16(1):53-88, 1995.
6. ARIMURA A, SOMOGYVARI-VIGH A, MIYATA A, MIZUNO K, COY DH, KITADA C: Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology*, 129(5):2787-9, 1991.
7. ARIMURA A: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regul Pept*, 37(3):287-303, 1992.
8. ARIMURA A: Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol*, 48(5):301-31, 1998.

9. BASAK A, TOURE BB, LAZURE C, MBIKAY M, CHRETIEN M, SEIDAH NG: Enzymic characterization in vitro of recombinant proprotein convertase PC4. *Biochem J*, (343 Pt) 1:29-37, 1999.
10. BASILLE M, GONZALEZ BJ, LEROUX P, JEANDEL L, FOURNIER A, VAUDRY H: Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience*, 57(2):329-38, 1993.
11. BEAUDET MM, BRAAS KM, MAY V: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) expression in sympathetic preganglionic projection neurons to the superior cervical ganglion. *J Neurobiol*, 36(3):325-36, 1998.
12. BOLER J, ENZMANN F, FOLKERS K, BOWERS CY, SCHALLY AV: The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun*, 37(4):705-10, 1969.
13. BOUTILLIER AL, MONNIER D, KOCH B, LOEFFLER JP: Pituitary adenyl cyclase-activating peptide: a hypophysiotropic factor that stimulates proopiomelanocortin gene transcription, and proopiomelanocortin-derived peptide secretion in corticotropic cells. *Neuroendocrinology*, 60(5):493-502, 1994.
14. BRAAS KM, BRANDENBURG CA, MAY V: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulation of ArT-20/D16v corticotrope cell proopiomelanocortin expression and secretion. *Endocrinology*, 134(1):186-95, 1994.
15. BRENNEMAN DE, HAUSER J, PHILLIPS TM: VIP and PACAP release chemokines: A mechanism for neuroprotection from HIV envelope protein toxicity. *Regul Pept*, 83:42, 1999.
16. BRENNEMAN DE, HAUSER JM, SPONG C, PHILLIPS TM: Chemokine release is associated with the protective action of PACAP-38 against HIV envelope protein neurotoxicity. *Neuropeptides*, 36(4):271-80, 2002.
17. BUSCAIL L, CAMBILLAU C, SEVA C, SCEMAMA JL, DE NEEF P y cols.: Stimulation of rat pancreatic tumoral AR4-2J cell proliferation by pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *Gastroenterology*, 103(3):1002-8, 1992.
18. CAMPARD PK, CROCHEMORE C, RENE F, MONNIER D, KOCH B y cols.: PACAP type I receptor activation promotes cerebellar neuron survival through the cAMP/PKA signaling pathway. *DNA Cell Biol*, 16:323-333 1997.
19. CAMPBELL RM, SCANES CG: Evolution of the growth hormone-releasing factor (GRF) family of peptides. *Growth Regul*, 2: 175-191, 1992.
20. CAVALLARO S, COPANI A, D'AGATA V, MUSCO S, PETRALIA S y cols.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol*, 50:60-66, 1996.
21. CHANG JY, KOROLEV VV, WANG JZ: Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett*, 206:181-184, 1996.
22. CHARTREL N, TONON M-C, VAUDRY H, CONLON JM: Primary structure of frog pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and effects of ovine PACAP on frog pituitary. *Endocrinology*, 129:3367-3371, 1991.
23. CHIODERA P, VOLPI R, CAPRETTI L, COIRO V: Effects of intravenously infused pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on arginine vasopressin and oxytocin secretion in man. *Neuroreport*, 6(11):1490-2, 1995.
24. COLEMAN DT, BANCROFT C: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates prolactin gene expression in a rat pituitary cell line. *Endocrinology*, 133(6):2736-42, 1993.
25. DOW RC, BENNIE J, FINK G: Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-38 (PACAP)-38 is released into hypophyseal portal blood in the normal male and female rat. *J Endocrinol*, 142(1):R1-4, 1994.
26. EDWARDS AV, JONES CT: Adrenal responses to the peptide PACAP in conscious functionally hypophysectomized calves. *Am J Physiol*, 266(6 Pt 1):E870-6, 1994.
27. EIPPER BA, STOFFERS DA, MAINS RE: The biosynthesis of neuropeptides: Peptide α -amidation. *Ann Rev Neurosci*, 15: 57-85, 1992.
28. EL-GEHANI F, ZHANG FP, PAKARINEN P, RANNIKKO, A HUHTANIEMI: Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod*, 58:116-123, 1998.
29. FUJIMIYA M, YAMAMOTO H, KUWAHARA A: Effect of VIP and PACAP on basal release of serotonin from isolated vascularly and luminally perfused rat duodenum. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 1):G731-9, 1998.
30. FUJIMIYA M, YAMAMOTO H, KUWAHARA A: Effect of VIP and PACAP on vascular and luminal release of serotonin from isolated perfused rat duodenum. *Ann N Y Acad Sci*, 865:495-502, 1998.
31. FUKUSHIMA Y, HIKICHI H, MIZUKAMI K, NAGAYAMA T, YOSHIDA M y cols.: Role of endogenous PACAP in catecholamine secretion from the rat adrenal gland. *Am J Physiol, Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281:R1562-R1567, 2001.
32. FUKUSHIMA Y, NAGAYAMA T, KAWASHIMA H, HIKICHI H, YOSHIDA M y cols.: Role of calcium channels and adenylate cyclase in the PACAP-induced adrenal catecholamine secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(2):R495-501, 2001.
33. GENG G, GASPO R, TRABELSI F, YAMAGUCHI N: Role of L-type Ca²⁺ channel in PACAP-induced adrenal catecholamine release in vivo. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 2):R1339-45, 1997.
34. GHATEI MA, TAKAHASHI K, SUZUKI Y, GARDINER J, JONES PM y cols.: Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol*, 136(1):159-66, 1993.
35. GILLARD E, MUSSSENDEN H, SNISSARENKO E, LEON-OLEA M, CURRAS-COLLAZO MC: Effects of pacap on vasopressin and excitatory amino acid release in the rat supraoptic nucleus in vitro. *Neurosci Abs*, 471.5.CD-ROM, 2002.
36. GILLARD ER, COBURN CG, BAUCE LG, SNISSARENKO EP, PITTMAN QJ, LEON-OLEA M, CURRAS-COLLAZO MC: Somatodendritic nitric oxide and pacap in son magnocellular neuroendocrine cell (MNC) responses to dehydration. *Neurosci Abs*, 612.19. CD-ROM, 2003.
37. GONZALEZ BJ, BASILLE M, VAUDRY D, FOURNIER A, VAUDRY H: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience*, 78:419-430, 1997.
38. GOTTSCHALL PE, TATSUNO I, MIYATA A, ARIMURA A: Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology*, 127(1):272-7, 1990.
39. GRAS S, HANNIBAL J, GEORG B, FAHRENKRUG J: Transient periovulatory expression of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in rat ovarian cells. *Endocrinology*, 137:4779-4785, 1996.
40. GRAS S, HEDETOFT C, PEDERSEN SH, FAHRENKRUG J: Pituitary adenylate cyclase-activating peptide stimulates acute progesterone production in rat

- granulosa/Lutein cells via two receptor subtypes. *Biol Reprod*, 63(1):206-12, 2000.
41. GUILLEMIN R, BRAZEAU P, BOHLEN P, ESCH F, LING N, WEHRENBURG WB: Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, 218(4572):585-7, 1982.
42. GUO X, WAKADE AR: Differential secretion of catecholamines in response to peptidergic and cholinergic transmitters in rat adrenals. *J Physiol (Lond)*, 475:539-545, 1994.
43. GUR G, BONFIL D, SAFARIAN H, NAOR Z, YARON Z: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and neuropeptide Y regulation of gonadotropin subunit gene expression in tilapia: role of PKC, PKA and ERK. *Neuroendocrinology*, 75(3):164-74, 2002.
44. GUR G, ROSENFELD H, MELAMED P, MEIRI I, ELIZUR A, YARON Z: Tilapia glycoprotein hormone alpha subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation. *Mol Cell Endocrinol*, 182(1):49-60, 2001.
45. HANNIBAL J: Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, 453(4):389-417, 2002.
46. HANNIBAL J, FAHRENKRUG J: Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene by rat spermatogenic cells. *Regul Pept*, 55:111-5, 1995.
47. HANNIBAL J, FAHRENKRUG J: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in intrinsic and extrinsic nerves of the rat pancreas. *Cell Tissue Res*, (1):59-70, 2000.
48. HARTFIELD PJ, BILNEY AJ, MURRAY AW: Neurotrophic factors prevent ceramide-induced apoptosis downstream of c-Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells. *J Neurochem*, 71(1):161-9, 1998.
49. HASHIMOTO H, HAGIHARA N, KOGA K, YAMAMOTO K, SHINTANI Y cols.: Synergistic induction of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression by nerve growth factor and PACAP in PC12 cells. *J Neurochem*, 74:501-507, 2000.
50. HASHIMOTO H, ISHIHARA T, SHIGEMOTO R, MORI K, NAGATA S: Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron*, 11:333-42, 1993.
51. HASHIMOTO H, YAMAMOTO K, HAGIGARA N, OGAWA N, NISHINO A y cols.: cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochim Biophys Acta*, 1281(2):129-33, 1996.
52. HEINDEL JJ, POWELL CJ, PASCHALL CS, ARIMURA A, CULLER MD: A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide, modulates Sertoli cell function in vitro. *Biol Reprod*, 47(5):800-6, 1992.
53. HEINDEL JJ, SNEEDEN J, POWELL CJ, DAVIS B, CULLER MD: A novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide regulates the function of rat granulosa cells in vitro. *Biol Reprod*, 54:523-530, 1996.
54. HOSOYA M, KIMURA C, OGI K, OHKUBO S, MIYAMOTO Y, KUGOH H y cols.: Structure of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochim Biophys Acta*, 1129:199-206, 1992.
55. HOSOYA M, ONDA H, OGI K, MASUDA Y, MIYAMOTO Y, OHTAKI T y cols.: Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun*, 194(1):133-43, 1993.
56. HYDE JF, MURAI I, BEN-JONATHAN N: Differential effects of pituitary stalk-section on posterior pituitary and hypothalamic contents of prolactin-releasing factor, oxytocin, dopamine and beta-endorphin. *Neuroendocrinology*, 48(3):314-9, 1988.
57. INOOKA H, OHTAKI T, KITAHARA O, IKEGAMI T, ENDO S y cols.: Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nat Struct Biol*, 8(2):161-5, 2001.
58. ISOBE K, NAKAI T, TAKUWA Y: Ca²¹-dependent stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine secretion from cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology*, 132:1757-1765, 1993.
59. JAMEN F, ALONSO G, SHIBUYA I, WIDMER H, VACHER CM y cols.: Impaired somatodendritic responses to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) of supraoptic neurones in PACAP type I-receptor deficient mice. *J Neuroendocrinol*, 15(9):871-81, 2003.
60. JIANG Y, LI WS, XIE J, LIN HR: Sequence and Expression of a cDNA Encoding Both Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide and Growth Hormone-releasing Hormone in Grouper (*Epinephelus coioides*). *Acta Biochimica et Biophysica SINICA*, 35:864-872, 2003.
61. JUST L, MORL F, BARMANN C, OLENIK C, MEYER DK: Evidence for cell specific regulation by PACAP38 of the proenkephalin gene expression in neocortical cells. *Glia*, 30(3):242-52, 2000.
62. KATAYAMA T, NAKASHIMA M, KYAN H, MURAKAMI N, KURODA H: A role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a regulator of paracrine interactions between folliculo-stellate cells and gonadotropes through the control of activin-follistatin interactions. *J Vet Med Sci*, 62(7):731-6, 2000.
63. KAWAI K, YOKOTA C, OHASHI S, ISOBE K, SUZUKI S y cols.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: effects on pancreatic-adrenal hormone secretion and glucose-lipid metabolism in normal conscious dogs. *Metabolism*, 43(6):739-44, 1994.
64. KIMURA C, OHKUBO S, OGI K, HOSOYA M, ITOH Y y cols.: A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun*, 166(1):81-9, 1990.
65. KIMURA S, OHSHIGE Y, LIN L, OKUMURA T, YANAIHARA C y cols.: Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neuroendocrinol*, 6(5):503-7, 1994.
66. KOCH B, LUTZ-BUCHER B: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates cyclic AMP formation as well as peptide output of cultured pituitary melanotrophs and AtT-20 corticotrophs. *Regul Pept*, 38(1):45-53, 1992.
67. KOTANI E, USUKI S, KUBO T: Detection of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide messenger ribonucleic acids (PACAP mRNA) and PACAP receptor mRNA in the rat ovary. *Biomed Res*, 18:199-204, 1997a.
68. KOTANI E, USUKI S, KUBO T: Rat corpus luteum expresses both PACAP and PACAP type IA receptor mRNAs. *Peptides*, 18(9):1453-5, 1997b.
69. KOVES K, KANTOR O, SCAMMELL JG, ARIMURA A: PACAP colocalizes with luteinizing and follicle-stimulating hormone immunoreactivities in the anterior lobe of the pituitary gland. *Peptides*, 19(6):1069-72, 1998.
70. KOVES K, MOLNAR J, KANTOR O, GORCS TJ, LAKATOS A, ARIMURA A: New aspects of the neuroendocrine role of PACAP. *Ann NY Acad Sci*, 805:648-54, 1996.
71. LAMOUCHE S, YAMAGUCHI N: Role of PAC(1) receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,

- 280(2):R510-8, 2001.
72. LEGRADI G, SHIODA S, ARIMURA A: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in autonomic regulatory areas of the rat medulla oblongata. *Neurosci Lett*, 176(2):193-6, 1994.
73. LEON-OLEA M, MUCIO-RAMIREZ S, SANCHEZ-ISLAS E, ANGELES-ESCUADERO A y cols.: Immunoreactivity to PACAP and NADPH-d activity are increased in osmotic activated rats. *Neurosci Abs*, 175.7 CD-ROM, 2002.
74. LI M, MBIKAY M, ARIMURA A: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor is processed solely by prohormone convertase 4 in the gonads. *Endocrinology*, 141(10):3723-30, 2000a.
75. LI M, MBIKAY M, NAKAYAMA K, MIYATA A, ARIMURA A: Prohormone convertase PC4 processes the precursor of PACAP in the testis. *Ann N Y Acad Sci*, 921:333-9, 2000b.
76. LI M, SHUTO Y, SOMOGYVARI-VIGH A, ARIMURA A: Prohormone convertases 1 and 2 process proPACAP and generate matured, bioactive PACAP38 and PACAP27 in transfected rat pituitary GH4C1 Cells. *Neuroendocrinology*, 69:217-226, 1999.
77. LI S, GRINEVICH V, FOURNIER A, PELLETIER G: Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on gonadotropin-releasing hormone and somatostatin gene expression in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 41(1-2):157-62, 1996.
78. LIU W, MOLLER M: Innervation of the rat pineal gland by PACAP-immunoreactive nerve fibers originating in the trigeminal ganglion: a degeneration study. *Cell Tissue Res*, 301(3):369-73, 2000.
79. LUMPKIN MD, MOLTZ JH, YU WH, SAMSON WK, MCCANN SM: Purification of FSH-releasing factor: its dissimilarity from LHRH of mammalian, avian, and piscine origin. *Brain Res Bull*, 18(2):175-8, 1987.
80. MATSUO H, BABA Y, NAIR RM, ARIMURA A, SCHALLY AV: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 43(6):1334-9, 1971.
81. MAZZOCCHI G, MALENDOWICZ LK, REBUFFAT P, GOTTARDO L, NUSSDORFER GG: Expression and function of vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and their receptors in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6):2575-80, 2002.
82. MCRORY JE, PARKER RL, SHERWOOD NM: Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *DNA Cell Biol*, 16:95-102, 1997.
83. MIYATA A, ARIMURA A, DAHL RR, MINAMINO N, UEHARA A y cols.: Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 164:567-74, 1989.
84. MIYATA A, JIANG L, DAHL RD, MINAMINO N, KITADA C y cols.: Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP-38). *Biochem Biophys Res Commun*, 170:643-648, 1990.
85. MOLLER K, SUNDLER F: Expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) and PACAP type I receptors in the rat adrenal medulla. *Regul Pept*, 63(2-3):129-39, 1996.
86. MOLLER M, FAHRENKRUG J, HANNIBAL J: Innervation of the rat pineal gland by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-immunoreactive nerve fibres. *Cell Tissue Res*, 296(2):247-57, 1999.
87. MONTERO M, YON L, KIKUYAMA S, DUFOUR S, VAUDRY H: Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *J Mol Endocrinol*, 25(2):157-68, 2000.
88. MORI T, KAWASHIMA T, BEPPU Y, TAKAGI K: Histamine release induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide from rat peritoneal mast cells. *Arzneimittelforschung*, 44:1044-1046, 1994.
89. MORIO H, TATSUNO I, TANAKA T, UCHIDA D, HIRAI A y cols.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neurotrophic factor for cultured rat cortical neurons. *Ann N Y Acad Sci*, 26;(805):476-81, 1996.
90. MORROW JA, LUTZ EM, WEST KM, FINK G, HARMAR AJ: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *FEBS Lett*, 329(1-2):99-105, 1993.
91. MUCIO-RAMIREZ S, CURRAS-COLLAZO M, LEON-OLEA M: Immunoreactivity to PAC-1 receptor and PACAP are increased in the supraoptic and paraventricular nuclei in osmotic activated rats. *IBRO Abs*, 3226. CD-ROM, 2003.
92. MURAKAMI Y, KOSHIMURA K, YAMAUCHI K, NISHIKI M y cols.: Roles and mechanisms of action of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in growth hormone and prolactin secretion. *Endocr J*, 48(2):123-32, 2001.
93. NAGY G, MULCHAHEY JJ, SMYTH DG, NEILL JD: The glycopeptide moiety of vasopressin-neurophysin precursor is neurohypophyseal prolactin releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 151(1):524-9, 1988.
94. NAKAHARA K, ABE Y, MURAKAMI T, SHIOTA K, MURAKAMI N: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is involved in melatonin release via the specific receptor PACAP-r1, but not in the circadian oscillator, in chick pineal cells. *Brain Res*, 939:19-25, 2002.
95. NERI G, ANDREIS PG, PRAYER-GALETTI T, ROSSI GP y cols.: Pituitary adenylate-cyclase activating peptide enhances aldosterone secretion of human adrenal gland: evidence for an indirect mechanism, probably involving the local release of catecholamines. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(1):169-73, 1996.
96. NOMURA M, UETA Y, SERINO R, YAMAMOTO Y, SHIBUYA I, YAMASHITA H: Effects of centrally administered pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on c-fos gene expression and heteronuclear RNA for vasopressin in rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology*, 69(3):167-80, 1999.
97. NUSSDORFER GG, MALENDOWICZ LK: Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides*, 19(8):1443-67, 1998.
98. O'FARRELL M, MARLEY PD: Multiple calcium channels are required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced catecholamine secretion from bovine cultured adrenal chromaffin cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 356: 536-542, 1997.
99. ODUM L, PETERSEN LJ, SKOV PS, EBSKOV LB: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is localized in human dermal neurons and causes histamine release from skin mast cells. *Inflamm Res*, 47:488-492, 1998.
100. OGI K, KIMURA C, ONDA H, ARIMURA A, FUJINO M: Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem Biophys Res Commun*, 173(3):1271-9, 1990.
101. OGI K, MIYAMOTO Y, MASUDA Y, HABATA Y, HOSOYA M y cols.: Molecular cloning and functional

- expression of a cDNA encoding a human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 196:1511-21, 1993.
102. OHKUBO S, KIMURA C, OGI K, OKAZAKI K, HOSOYA M y cols.: Primary structure and characterization of the precursor to human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *DNA Cell Biol*, 11:21-30, 1992.
103. OKAMURA H, MIYAGAWA A, TAKAGI H, ESUMI H y cols.: Co-existence of PACAP and nitric oxide synthase in the rat hypothalamus. *Neuroreport*, 5:1177-80, 1994.
104. OKAZAKI K, ITOH Y, OGI K, OHKUBO S, ONDA H: Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides*, 16:1295-1299, 1995.
105. OKAZAKI K, KIMURA C, KOSAKA T, WATANABE T, OHKUBO S y cols.: Expression of human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) cDNA in CHO cells and characterization of the products. *FEBS Lett*, 298:49-56, 1992.
106. OLSSON C, HOLMGREN S: PACAP and nitric oxide inhibit contractions in the proximal intestine of the atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Exp Biol*, 203 Pt 3:575-83, 2000.
107. ONOUE S, ENDO K, YAJIMA T, KASHIMOTO K: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide regulates the basal production of nitric oxide in PC12 cells. *Life Sci*, 71(2):205-14, 2002.
108. ORTMANN O, ASMUS W, DIEDRICH K, SCHULZ KD, EMONS G: Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells. *Eur J Endocrinol*, 140(3):207-14, 1999.
109. PISEGNA JR, WANK SA: Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 90(13):6345-9, 1993.
110. POHL M, WANK SA: Molecular cloning of the helodermin and exendin-4 cDNAs in the lizard. Relationship to vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and glucagon-like peptide 1 and evidence against the existence of mammalian homologues. *J Biol Chem*, 273:9778-9784, 1998.
111. RADZIKOWSKA M, WASILEWSKA-DZIUBINSKA E, BARANOWSKA B: The stimulatory effect of VIP and PACAP on adrenal aldosterone release. *Ann N Y Acad Sci*, 865:482-5, 1998.
112. RAWLINGS SR, HEZAREH M: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endocr Rev*, 17(1):4-29, 1996.
113. REGLODI D, LENGVARI I, SZELIER M, VIGH S, ARIMURA A: Distribution of PACAP-like immunoreactivity in the nervous system of oligochaeta. *Peptides*, 21(2):183-8, 2000.
114. RENE F, MONNIER D, GAIDDON C, FELIX JM, LOEFFLER JP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide transduces through cAMP/PKA and PKC pathways and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in mouse melanotopes. *Neuroendocrinology*, 64(1):2-13, 1996.
115. RIBELAYGA C, PEVET P, SIMONNEAUX V: Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res*, 777:247-250, 1997.
116. ROMANELLI F, FILLO S, ISIDORI A, CONTE D: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro. *Neuropeptides*, 31(4):311-7, 1997.
117. ROMANO D, MAGALON K, CIAMPINI A, TALET C y cols.: Differential involvement of the Ras and Rap1 small GTPases in vasoactive intestinal and pituitary adenylate cyclase activating polypeptides control of the prolactin gene. *J Biol Chem*, 278:51386-94, 2003.
118. ROSSATO M, NOGARA A, GOTTARDELLO F, BORDON P, FORESTA C: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates rat Leydig cell steroidogenesis through a novel transduction pathway. *Endocrinology*, 138:3228-3235, 1997.
119. SCHMIDT-CHOUDHURY A, FURUTA GT, GALLI SJ, SCHMIDT WE, WERSHIL BK: Mast cells contribute to PACAP-induced dermal oedema in mice. *Regul Pept*, 82:65-69, 1999a.
120. SCHMIDT-CHOUDHURY A, MEISSNER J, SEEBECK J, GOETZL EJ y cols.: Stem cell factor influences neuro-immune interactions: The response of mast cells to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is altered by stem cell factor. *Regul Pept*, 83:73-80, 1999b.
121. SCHOMERUS C, LAEDTKE E, OLCESE J, WELLER JL y cols.: Signal transduction and regulation of melatonin synthesis in bovine pinealocytes: impact of adrenergic, peptidergic and cholinergic stimuli. *Cell Tissue Res*, 309:417-28, 2002.
122. SEEBECK J, SCHMIDT WE, KILBINGER H, NEUMANN J y cols.: PACAP induces bradycardia in guinea-pig heart by stimulation of atrial cholinergic neurones. *Nannyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354:424-430, 1996.
123. SEIDAH NG, DAY R, MARCINKIEWICZ M, CHRETIEN M: Precursor convertases: An evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 839:9-24, 1998.
124. SEKI T, IZUMI S, SHIODA S, ZHOU CJ, ARIMURA A, KOIDE R: Gene expression for PACAP receptor mRNA in the rat retina by in situ hybridization and in situ RT-PCR. *Ann N Y Acad Sci*, 921:366-9, 2000.
125. SEKIYA K, NAGASAKI H, OZAKI N, SUZUKI A, MIURA Y, OISO Y: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents cytokine-induced cytotoxicity via inhibition of inducible nitric oxide synthase expression in beta TC cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 278(1):211-6, 2000.
126. SHEWARD WJ, LUTZ EM, COPP AJ, HARMAR AJ: Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC-1) receptor mRNA during development of the mouse embryo. *Brain Res Dev Brain Res*, 109(2):245-53, 1998.
127. SHIODA S, LEGRADI G, LEUNG WC, NAKAJO S, NAKAYA K, ARIMURA A: Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its messenger ribonucleic acid in the rat testis by light and electron microscopic immunocytochemistry and in situ hybridization. *Endocrinology*, 135:818-825, 1994.
128. SHOGE K, MISHIMA HK, SAITOH T, ISHIHARA K y cols.: Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res*, 839:66-73, 1999.
129. SHUTO Y, UCHIDA D, ONDA H, ARIMURA A: Ontogeny of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor mRNA in the mouse brain. *Regul Pept*, 67(2):79-83, 1996.
130. SILVEIRA MS, COSTA MR, BOZZA M, LINDEN R: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents induced cell death in retinal tissue through activation of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 277:16075-80, 2002.
131. SIMONNEAUX V, OUICHOU A, PEVET P: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain Res*, 603:148-152, 1993.
132. SOMOGYVARI-VIGH A, REGLODI D, LI M, LENGVARI I, VIGH S, ARIMURA A: Tissue distribution of PACAP27

- and -38 in oligochaeta: PACAP27 is the predominant form in the nervous system of *Lumbricus polyphemus*. *Peptides*, 21:1185-91, 2000.
133. SQUIRE, FLOYDE, BLOOMSK, MCCONNELL J y cols.: *Fundamental Neuroscience*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, 2003.
 134. SUZUKI N, HARADA M, HOSOYA M, FUJINO M: Enhanced production of pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide by 1, N⁶-dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate, phorbol 12-myristate 13-acetate and by the polypeptide itself in human neuroblastoma cells, IMR-32. *Eur J Biochem*, 223:147-153, 1994.
 135. TAKAHASHI K, TOTSUNE K, MURAKAMI O, SATOH F, SONE M y cols.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like immunoreactivity in human hypothalamus: co-localization with arginine vasopressin. *Regul Pept*, 50(3):267-75, 1994.
 136. TANAKA K, SHIBUYA I, HARAYAMA N, NOMURA M, KABASHIMA N y cols.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide potentiation of Ca²⁺ entry via protein kinase C and A pathways in melanotrophs of the pituitary pars intermedia of rats. *Endocrinology*, 138(10):4086-95, 1997.
 137. TANAKA K, SHIBUYA I, NAGAMOTO T, YAMASHITA H, KANNO T: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide causes rapid Ca²⁺ release from intracellular stores and long lasting Ca²⁺ influx mediated by Na⁺ influx-dependent membrane depolarization in bovine adrenal chromaffin cells. *Endocrinology*, 137:956-966, 1996.
 138. THOMAS GB, CUMMINS JT, GRIFFIN N, CLARKE I: Effect and site of action of hypothalamic neuropeptides on prolactin release in sheep. *J Neuroendocrinology*, 48(3):252-7, 1988.
 139. TOHEI A, MATSUZAKI M, KOGO H: Antagonist of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide suppresses prolactin secretion without changing the activity of dopamine neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology*, 73(1):68-74, 2001.
 140. UEMURA S, POMPOLO S, FURNESS JB, HARDY KJ: Nitric oxide synthase in neurons of the human gall-bladder and its colocalization with neuropeptides. *J Gastroenterol Hepatol*, 12(3):257-65, 1997.
 141. VALE W, SPIESS J, RIVIER C, RIVIER J: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 213(4514):1394-7, 1981.
 142. VARGAS MA, BOURDAIS J, SANCHEZ S, URIOSTEGUI B, MORENO E y cols.: Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *J Neuroendocrinol*, 10(3):199-206, 1998.
 143. VAUDRY D, FALLUEL-MOREL A, BASILLE M, PAMANTUNG TF y cols.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide prevents C2-ceramide-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J Neurosci Res*, 72(3):303-16, 2003.
 144. VAUDRY D, GONZALEZ BJ, BASILLE M, PAMANTUNG TP y cols.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) promotes cerebellar granule cell survival through inhibition of caspase-3 activity (*Abstract*). *FENS 2000, Fédération of European Neuroscience Societies, June 24-28, Brighton 2000*.
 145. VAUDRY, GONZALEZ J, BASILLE M, YON L, FOURNIER A, VAUDRY H: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: From structure to functions. *Pharmacological Reviews*, 52:269-324, 2000.
 146. VILLALBA M, BOCKAERT J, JOURNOT L: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci*, 17:83-90, 1997.
 147. WATANABE T, MASUO Y, MATSUMOTO H, SUZUKI N, OHTAKI T y cols.: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide provokes cultured rat chromaffin cells to secrete adrenaline. *Biochem Biophys Res Commun*, 182:403-411, 1992.
 148. WATANABE T, SHIMAMOTO N, TAKAHASHI A, FUJINO M: PACAP stimulates catecholamine release from adrenal medulla: a novel noncholinergic secretagogue. *Am J Physiol*, 269(5 Pt 1):E903-9, 1995.
 149. WEST AP, MCKINNELL C, SHARPE RM, SAUNDERS PTK: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide can regulate testicular germ cell protein synthesis *in vitro*. *J Endocrinol*, 144:215-223, 1995.
 150. WINTERS SJ, TSUJII T, ATTARDI B: Effects of GnRH and PACAP on gonadotropin secretion and subunit messenger RNAs. *Ann N Y Acad Sci*, 805:343-52, 1996.
 151. YAMAGUCHI N, FUKUSHIMA Y: PACAP enhances stimulation-induced norepinephrine release in canine pancreas *in vivo*. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(7-8):788-97, 1998.
 152. YON L, FEUILLOLEY M, CHARTREL N, ARIMURA A y cols.: Localization, characterization and activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the frog adrenal gland. *J Endocrinol*, 139(2):183-94, 1993.
 153. YUWILER A, BRAMMER GL, BENNETT BL: Interaction between adrenergic and peptide stimulation in the rat pineal: Pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Neurochem*, 64:2273-2280, 1995.
 154. ZHONG Y, KASSON BG: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 135:207-213, 1994.