

ANECDOTARI DEL DESCOBRIMENT DE LA DIABETIS PANCREOPRIVA I DEL DESCOBRIMENT DE LA INSULINA, FINS ALS PRIMERS MESOS DE LA INSULINOTERÀPIA

R. CARRASCO I FORMIGUERA

Assistent a l'Institut de Fisiologia de Barcelona (1921-1939)
Professor titular de Fisiologia de l' "Institut de Medicina Experimental"
de la "Universidad Central de Venezuela", Caracas.

I. DIABETIS PANCREOPRIVA

A) ANTECEDENTS

Començant per Cawley el 1788 (23), havien estat publicades diferents troballes de lesions pancreàtiques en cadàvers de diabètics (13, 44, 45, 76), i als voltants del 1890 era àmpliament admesa una relació de causa-efecte entre trastorns pancreàtics i algunes formes de diabetis sacarina.

Començant per Brunner el 1683 (14), havien estat publicats diferents experiments d'extirpació de pàncreas en gossos, tots (amb una sola excepció) duts a terme amb finalitats que no tenien res a veure amb la diabetis (9, 33, 37, 54, 80). És gairebé segur que en tots aquests experiments, sense excloure l'únic que el 1869 havien fet Klebs i Munk (37), amb la intenció de produir una diabetis experimental, la pancreatectomia mai no havia estat absolutament total i tots els animals que havien sobreviscut a l'operació i al període postoperatori havien continuat vivint força temps sense que res durant aquesta supervivència hagués mogut els respectius investigadors a pensar en una diabetis. És interessant de subratllar el fet que un gos que el 1683 havia estat pancreatectomitzat per Brunner (14), probablement amb extirpació gairebé total de la glàndula, presentà polidípsia i poliúria prou marcades per a cridar l'atenció de l'investigador, però aquest no pensà pas que hagués pogut produir una diabetis sacarina.

B) EL DESCOBRIMENT

Especialment digne d'ésser subratllat és el fet que la primera pancreatectomia efectivament total de què hom té coneixement, la qual con-

duí Minkowski al descobriment de la diabetis pancreopriva, fou feta amb l'objecte exclusiu d'estudiar el paper del pàncreas en la digestió dels greixos, sense pensar poc ni molt en la diabetis. Per tal com les primeres publicacions que donaren la notícia del descobriment de la diabetis pancreopriva foren signades per von Mering y Minkowski (55, 56) —així, en aquest ordre— ha d'estranyar el fet que el descobriment sigui aquí atribuït exclusivament a Minkowski. Aquest fet està fonamentat en dues fonts que semblen molt fidedignes. Una d'elles és una declaració explícita en aquest sentit de Naunyn (66), que en el moment del descobriment era cap del laboratori on aquest fou dut a terme. L'altra font és una lletra de Minkowski a un amic que, sorprès per la declaració de Naunyn, havia demanat aclariments a Minkowski. Aquesta lletra fou publicada el 1952 en un article de Houssay (35), del qual són tretes la major part de les dades que segueixen relacionades amb el descobriment.

Oscar Minkowski (fig. 1), de família jueva, nasqué a Alexoten (Kowno, o Kaunas, Letònia, que llavors formava part de l'Imperi Rus), el 1858; el 1872 passà a Alemanya i esdevingué prussià naturalitzat; durant molts anys fou assistent a la Clínica mèdica d'Estrasburg, sota la direcció de Naunyn. Després fou professor de Medicina interna successivament a Greifswald i a Breslau i, ja jubilat, morí el 1931. El 1927 jo vaig tenir l'honor i el plaer de visitar-lo a casa seva, ja jubilat, a Wiesbaden.

Durant la seva estada a Estrasburg, el jove Minkowski féu amistat amb Joseph von Mering, que tenia pocs anys més que ell i treballava a l'Institut Hoppe-Seiler de la mateixa ciutat alsaciana, que llavors formava part de l'Imperi Alemany. Von Mering estava interessat en l'ús clínic d'un cert oli amb un 6 % d'àcids grassos lliures anomenat «lipalin». Un dia d'abril de 1889 Minkowski anà a l'Institut Hoppe-Seiler per tal de fer-hi una consulta bibliogràfica, i així, casualment, es trobà amb von Mering, i els dos amics conversaren en termes més o menys semblants als que segueixen (35, pàg. 113): von Mering demanà a Minkowski si a la clínica de Naunyn usaven lipalin.

—Oh no! —contestà Minkowski, tot fent-hi broma—: nosaltres no més usem mantega fresca de la bona; mai no donem oli ranci als nostres malalts.

—No siguis sarcàstic —respongué von Mering—: els homes sans han de desdoblar els greixos abans d'absorbir-los; però, si el pàncreas no funciona com cal, és necessari donar greixos ja desdoblats.

Minkowski llavors preguntà:

—És demostrat experimentalment això?



FIG. 1. Oscar Minkowski, descobridor de la diabetis pancreopriva.—Fotogratat del llibre *The Story of Insulin* (87).

The Journal of Laboratory and Clinical Medicine

VOL. VII

ST. LOUIS, FEBRUARY, 1922

No. 5

ORIGINAL ARTICLES

THE INTERNAL SECRETION OF THE PANCREAS*

BY F. G. BANTING, M.B., AND C. H. BEST, B.A.

THE hypothesis underlying this series of experiments was first formulated by one of us in November, 1920,[†] while reading an article dealing with the relation of the isles of Langerhans to diabetes.¹ From the passage in this article, which gives a résumé of degenerative changes in the acini of the pancreas following ligation of the ducts, the idea presented itself that since the acinous, but not the islet tissue, degenerates after this operation, advantage might be taken of this fact to prepare an active extract of islet tissue. The subsidiary hypothesis was that trypsinogen or its derivatives was antagonistic to the internal secretion of the gland. The failures of other investigators in this much-worked field were thus accounted for.

The feasibility of the hypothesis having been recognized by Professor J. J. R. Macleod, work was begun, under his direction, in May, 1921, in the Physiological Laboratory of the University of Toronto.

In this paper no attempt is made to give a complete review of the literature. A short résumé, however, of some of the outstanding articles which tend to attribute to the isles of Langerhans the control of carbohydrate metabolism, is submitted.

In 1889 Mering and Minkowski² found that total pancreatectomy in dogs resulted in severe and fatal diabetes. Following this, many different observers experimented with animals of various species and found in all types examined, a glycosuria and fatal cachexia after this operation. The fact was thus established that the pancreas was responsible for this form of diabetes. In 1884, Arnozan and Vaillard³ had ligated the pancreatic ducts in rabbits and found that within twenty-four hours the ducts become dilated; the epithelial cells begin to desquamate; and that there are protoplasmic changes in the acinous cells. On the seventh day there is a beginning of

*From the Physiological Department, University of Toronto, Canada.

†F.G.B., then Assistant in Physiology at Western University, London, Ontario.

FIG. 2. Primera pàgina del primer article extens signat per Banting i Best en el qual és descrita la gènesi i els primers experiments del treball que els va portar al descobriment de la insulina (3).

—No és pas fàcil —respongué von Mering—, perquè els ferments lipolítics del pàncreas passen al budell fins i tot després de lligar el conducte pancreàtic.

—Bé, doncs —digué Minkowski—, extirpa tot el pàncreas.

—És una operació impossible —respongué von Mering.

Minkowski, ignorant que tal impossibilitat havia estat afirmada per Claude Bernard (10) i portat pel seu optimisme juvenil i pel record dels seus èxits en cirurgia experimental, exclamà:

—Bah!, no hi ha pas operacions impossibles; dóna'm un gos i avui mateix li trauré tot el pàncreas.

—Bé —respongué von Mering—: tinc un gos que et puc deixar; així, doncs, prova-ho.

A la tarda d'aquell mateix dia, ajudat per von Mering, Minkowski extirpà totalment el pàncreas al gos que el seu amic li havia proporcionat; l'operació anà molt bé, l'animal se'n reféu i sobrevisqué quatre setmanes. L'endemà de l'operació, von Mering s'hagué d'absentar i no tornà a Estrasburg fins al cap de més d'una setmana. Al laboratori de la clínica mèdica no hi havia cap gàbia disponible, i el gos hagué d'estar lligat en un racó, tret algunes vegades cada dia quan, obeint ordres de Minkowski, el servent del laboratori el treia al pati per tal que l'animal hi fes les seves necessitats. Malgrat això, ja des del primer dia després de l'operació, el gos orinà algunes vegades dins el laboratori, per la qual cosa Minkowski reptà el servent, creient que aquest no havia tret el gos al pati prou sovint. El servent, però, es defensà dient que sí, que havia tret el gos al pati força vegades, però aquell gos era molt especial i moltes vegades orinava al laboratori encara que ho hagués fet al pati molt poc abans. Aquesta observació féu que Minkowski, més ben preparat que Brunner —que, com hem vist, havia fet una observació semblant 205 anys abans—, pensés en la possibilitat que el gos tingués glucosúria, fes l'examen corresponent i trobés un 12 % de glucosa a l'orina. De moment va pensar que potser von Mering —que era el descobridor de la glucosúria floridzínica i tenia en estudi alguns gossos amb aquest trastorn experimental— li hagués portat un gos ja glucosúric. Però, per si de cas, en els dies següents féu, ell tot sol, tres altres pancreatectomies totals, després d'assegurar-se que els animals no fossin glucosúrics abans de l'operació. Dos del gossos operats moriren cap a les 48 hores, de gangrena del duodè, però després d'haver presentat glucosúria, i l'altre sobrevisqué algunes setmanes i, igual que el primer, presentà glucosúria i desenvolupà una síndrome diabètica típica que indubtablement fou la causa de la mort tant d'aquest com del primer gos pancreatectomitat. Quan von Mering tornà a Estrasburg no es preocupà pas del gos que havia ajudat a operar, i fou per pura casualitat

que alguns dies després del seu retorn els dos amics es trobaren novament i altra vegada tingueren una breu conversa. Minkowki digué:

—Saps, von Mering, que tots els gossos pancreatectomitzats esdevenen diabètics?

—És interessant —respongué von Mering—: hem de prosseguir aquesta qüestió.

Després d'això, Minkowski operà tota una sèrie de gossos, algunes vegades, però no pas totes, ajudat per von Mering. Tots el gossos d'aquesta segona sèrie presentaren glucosúria i els que sobrevisqueren prou temps desenvoluparen una síndrome diabètica. Una vegada, von Mering provà d'operar ell, però l'animal morí a la taula, d'hemorràgia operatoria, i mai més no ho intentà. Va prendre alguna part en alguns detalls de l'estudi dels animals, especialment en les determinacions de glucogen hepàtic, suggerides per Minkowski, en la tècnica de les quals von Mering era expert; però altres ocupacions el privaven d'anar regularment al laboratori, i deixà que Minkowski continués ell tot sol el treball i redactés també tot sol els manuscrits dels dos articles, el primer molt breu, publicat el 8 de juny de 1889 (55), i el segon força extens, publicat el 17 de gener de 1890 (56), amb els quals es donaren les primeres notícies públiques del seu descobriment. Que aquest descobriment sigui generalment conegut i esmentat com a obra de von Mering i Minkowski és degut al fet que, tenint en compte els pocs anys més d'edat del primer, l'ordre alfabètic, i algunes altres circumstàncies la consideració de les quals posa en relleu la noble qualitat humana de Minkowski, aquest, no tan sols ajuntà el nom de von Mering al seu, sinó que el posà al primer lloc.

Per notable coincidència, el mateix any de la publicació del primer dels articles esmentats signats per von Mering i Minkowski i abans de la publicació del segon, de Dominicis (27), desconeixent, segons sembla, el primer d'aquells articles, publicà resultats semblants als trobats per Minkowski, però no pas idèntics, per tal com alguns dels seus gossos, que ell donà per totalment pancreatectomitzats, no esdevingueren diabètics. Els resultats de Minkowski foren aviat confirmats per altres investigadors. Després de la publicació del segon article al començament del 1890, von Mering no s'ocupà mai més de la diabetis pancreopriva. Minkowski, però, continuà treballant i publicant, solament amb el seu nom, sobre el mateix tema (57, 58, 59, 60, 61).

C) LA HIPOTÈSI D'UNA SECRECIÓ INTERNA DEL PÀNCREAS

El 1882, abans del descobriment de Minkowski i que ningú hagués parlat d'una secreció interna del pàncreas, Kühne i Lea (41) comen-

taren la prominent estructura glandular dels grups de cèl·lules epitelials descrits per Langerhans (47) i la manca de conductes excretors i de limfàtics d'aquells grups, i en deduïren que el producte de secreció d'aquelles cèl·lules glandulars havia de passar directament a la sang. En cap dels dos articles signats per von Mering i Minkowski no trobem cap esment literal d'una «secreció interna del pàncreas», però en el segon, com a l'explicació més versemblant del fet que l'extirpació del pàncreas sigui causa de diabetis, donen textualment «la supressió d'alguna especial funció d'aquest òrgan essencialment necessària per al normal aprofitament del sucre per l'organisme» (3, pàgina 384). Lépine (48) fou el primer, ja el 1889, a confirmar, coneixent-los, els resultats de Minkowski i a atribuir-los textualment a la «supressió d'una secreció interna del pàncreas». Cometé, però, l'error, oportunament rebut per Minkowski (60), de creure que la tal secreció interna del pàncreas fos el mateix ferment que és responsable de la glucòlisi a la sang «in vitro».

La hipòtesi d'una secreció interna del pàncreas, no identificada, però l'absència de la qual és causa de diabetis en el gos, fou explícitament proposada i sòlidament basada en fets experimentals successivament per Minkowski (60), Hédon (34) i Lancereaux i Thiroloix (46). L'any 1892 aquests investigadors dugueren independentment a terme experiments de trasplantació subcutània de porcions irrigades i innervades de pàncreas amb extirpació de tota la resta d'aquest òrgan, sense que se'n seguís diabetis, fins i tot després de lligar i seccionar el pedicle vasculonerviós de la trasplantació, quan aquesta ja havia esdevingut un empelt autònom, amb irrigació local pròpia, però sense innervació. Després d'això, la simple operació d'extirpar l'empelt subcutani fou ràpidament seguida d'aparició d'una síndrome diabètica.

Els resultats de diferents experiments publicats el 1911 (30), 1912 (16), 1915 (17) i 1916 a 1919 (19, 20, 21) feren gairebé indubtable la presència de la substància que el 1922 rebé el nom d'insulina en la sang circulant d'animals normals i fins i tot en la de gosses preyades pancreatectomitzades —en aquest cas procedent del fetus— i en solucions salines passades del pàncreas d'animals normals. La demostració indiscutible de la presència d'insulina en la sang d'animals normals fou donada per La Barre (42) sis anys després de la publicació del descobriment de Banting i Best el 1922.

II. INSULINA

A) ANTECEDENTS

a) *Intents de pancreatoteràpia de la diabetis*

En el transcurs del període 1892-1921 nombrosos investigadors assajaren el tractament de la diabetis clínica o experimental mitjançant l'administració oral o parenteral de pàncreas fresc o de diferents preparats pancreàtics. La gran majoria d'aquests assaigs, començant pels de Minkowski el 1892 (59), fracassaren totalment (1, 7, 12, 25, 29, 31, 49, 74, 81, etc.). No obstant això, ja des de Capparelli, el 1893 (15), alguns investigadors obtingueren resultats encoratjadors: almenys, reducció considerable de la glucosúria (11, 32, 39, 40, 52, 63, 64, 65, 68, 69, 79, 87, 88). De tots aquests, tan sols Zuelzer (88) i Forschbach (31) publicaren resultats indubtablement positius en diabètics humans, i tots ells, per diferents raons, abandonaren definitivament llurs assaigs o bé els reprengueren (62, 70, 71, 72, 73) només després de la publicació dels primers articles de Banting i Best el 1922 (34).

b) *Els illots de Langerhans, lloc de producció de la secreció interna del pàncreas*

El 1869, Langerhans (47) descriuí en el pàncreas els grups, que avui porten el seu nom, de cèl·lules epitelials de tipus glandular voltats de teixit acinar, molt vascularitzats i sense comunicació amb cap conducte excretor. Hem vist que el 1882 Kühne i Lea (41), havien deduït dels seus estudis histològics la hipòtesi que la secreció que poguessin produir les agrupacions cel·lulars descrites per Langerhans havia de passar directament a la sang, sense parlar, però, de quina pogués ésser la funció d'aquella hipotètica secreció. Diamare fou probablement el primer, el 1889 (28), a emprar la denominació «*isole di Langerhans*» —per a nosaltres «*illots de Langerhans*»— i a suggerir que els tals illots fossin el lloc de producció d'allò que ell en va dir «*secreció interna*» del pàncreas. Aquesta hipòtesi fou novament postulada per altres autors en anys successius (43, 76), rebé un fort suport clínic quan Opie, el 1901 (67), publicà la seva troballa de lesions precisament en els illots de Langerhans en alguns casos de diabetis humana, i rebé així mateix fort suport dels experiments d'oclusió dels conductes excretors del pàncreas que seran considerats tot seguit.

El 1884, d'Arnozan i Vaillard (26) lligaren el conducte de Wirsung de conills i al cap d'algun temps trobaren que la glàndula s'havia convertit gairebé en un manyoc d'una mena de cordons fibrosos entre els

quals havien quedat indemnes uns grups de cèl·lules epitelials. Aquest experiment fou ulteriorment repetit i poc o molt modificat i ampliat per altres investigadors, entre ells Schultze (78), i Ssobolew (82), tots dos el 1900. Aquests dos investigadors foren els primers, independentment l'un de l'altre, d'identificar com a illots de Langerhans els grups de cèl·lules epitelials que queden indemnes en atrofiar-se el teixit acínic. Dels resultats dels experiments de Schultze, de Ssobolew, i de llurs seguidors (36, 38, 50, 53, 75), en quedà ben clar que en alguns casos d'atròfia pancreàtica per obstrucció dels conductes excretors hi hagué glucosúria, però en aquests casos fou trobada alguna alteració dels illots de Langerhans, mentre que, contràriament, en els casos en què no hi hagué cap alteració dels illots, tampoc no hi hagué glucosúria.

Així, doncs, des del treball esmentat d'Opie el 1901, era gairebé indubtable el paper dels illots de Langerhans en la producció de la secreció interna del pàncreas d'acció antidiabètica, i ho fou més encara quan, pel novembre de 1920, Barron (6) publicà un article en el qual, després de comentar els treballs signants per von Mering i Minkowski i les troballes abans esmentades de d'Arnozan i Vaillard i d'alguns de llurs seguidors, descriuí les seves pròpies observacions clíniques en pacients amb atròfia pancreàtica causada per obstrucció litiàsica dels conductes excretors. D'aquests pacients només alguns presentaren alteracions dels illots, i en aquests hi hagué diabetis; però aquells en els quals els illots es trobaren indemnes no foren diabètics.

c) *Suggeriments de possibles explicacions dels fracassos de la pancreatoteràpia i de possibles camins per a obtenir-ne resultats satisfactoris.*

Diferents investigadors suggeriren la possibilitat que els fracassos de la pancreatoteràpia per via oral fossin deguts al fet que el suc gàstric o els ferments pancreàtics o intestinals destorbessin d'alguna manera l'acció de la secreció interna del pàncreas (22, 24, 25). Per aquest motiu alguns autors preconitzaren i assajaren la via parenteral. El 1902, Ssobolew (83) repetí en diferents mamífers els seus experiments del 1900 i probablement fou el primer de suggerir explícitament la probabilitat que els fracassos anteriors de la pancreatoteràpia per via parenteral fossin deguts a alguna acció *in situ* dels enzims pancreàtics pertorbadora de l'acció de la secreció interna. D'altra banda, Ssobolew observà que, en l'espècie bovina, en els animals acabats de néixer els illots es trobaven molt més desenvolupats que el teixit acínic, i finalment escriví: ... «Aquest aïllament anatòmic dels illots fa possible d'assajar d'una manera racional l'organoteràpia de la diabetis... així mateix hom podria emprar pàncreas d'animals acabats de néixer, per exemple

vedells... en els nou nats el pàncreas participa ben poc en el treball digestiu i hom pot esperar que en el seu extret la part digestiva no destorbi l'acció de la substància elaborada pels illots. En tot cas, és d'esperar que no trigarà pas gaire a ésser resolta la qüestió de si per aquests camins hom podrà arribar a alleujar els sofriments dels diabètics». Sembla extraordinari que una visió profètica tan encertada no mogué el seu autor a tractar de posar-la ell mateix en pràctica. És igualment sorprenent que haguessin de passar gairebé vint anys abans que Banting —que d'una manera indirecta tingué notícia dels experiments de d'Arnozan i Vaillard i de llurs seguidors, àdhuc alguns dels de Ssobolew, però que es pot assegurar que no havia pas llegit els articles originals d'aquest darrer i no sabia res de les seves paraules que acaben d'ésser transcrits— concebés idees en part idèntiques i en part molt semblants a les de Ssobolew i les posés en pràctica amb resultats satisfactoris.

d) *Banting i Best.*

La ignorància de les idees i els suggeriments de Ssobolew explica que Banting, en descriure el 1922, juntament amb Best (3), les conseqüències de la seva lectura de l'article abans esmentat de Barron, presentés amb indubtable bona fe com a originals seves una hipòtesi i una idea que havien estat clarament formulades per Ssobolew vint anys abans. El fet és que en el primer article extens signat per Banting i Best pel febrer de 1922 (fig. 2) es pot llegir el que segueix: «La hipòtesi en què es fonamenta aquesta sèrie d'experiments fou formulada per un de nosaltres (F.G.B.) pel novembre de 1920 en llegir un article que tractava de la relació entre els illots de Langerhans i la diabetis. Del passatge en què aquest article dóna un resum dels canvis degeneratius en els àcini del pàncreas consecutius a la lligadura dels conductes, sorgí la idea que, atès que el teixit acínic, però no pas l'insular, degenera després de l'operació, aquest fet podria ésser aprofitat per a preparar un extret actiu del teixit insular. La hipòtesi subsidiària fou que el tripsinogen o algun dels seus derivats era antagònic de la secreció interna de la glàndula».

Frederick Grant Banting, cirurgià militar en la primera guerra mundial i després cirurgià ortopèdic i «demostrador de Fisiologia i Anatomia» a la «Western University», a London, Ontario, Canadà, havia nascut l'any 1891 en una granja del petit poble d'Alliston, Ontario. En la seva infantesa fou molt amic d'una nena veïna, molt sovint companya seva de jocs. Aquesta nena esdevingué diabètica i morí en coma. Banting en fou molt afectat i la seva pena despertà en ell un gran interès per



FIG. 3. Best a l'esquerra i Banting a la dreta, amb un dels primers gossos pancreatetectomitzats tractats amb el que llavors en deien *isletin*. — Fotogratat del llibre *The Story of Insulin* (87).

5-00 P.M. dog in good condition ⁴⁷
 Aug. 7th
 1:2 midnight (Aug 6 - Aug 7th)
 Blood sugar - .43
 Vol urine from 2 P.M. to
 12 midnight - 175 cc.
 (the last 30 cc being catheter specimen
 separate sugar estimation)
 ← 10-hour total sugar - 3.36g.
 " " nitrogen - 1.20g
 " " G : N ratio - 2.8
 ① 8 cc Isletin given

1. A.M.
 Blood sugar - .37.
 no urine obtained by catheter
 dog about same - able to
 stand up + walk, has not
 vomited since yesterday aft
 ② 8 cc Isletin given.

2 A.M. Blood Sugar .33
 ③ 8 cc Isletin ^{no urine obtained}

3 A.M. Blood Sugar - .29
 ④ 8 cc Isletin ^{no urine obtained}

FIG. 4. Full d'un llibre de notes de Banting i Best corresponent a la nit del 6 al 7 d'agost de 1921 (vegeu text). — Fotogravat del llibre *The Story of Insulin* (87).

la diabetis i, en ésser metge, pels possibles mitjans de tractar eficaçment aquesta malaltia. Aquest interès explica que Banting escrivís les següents paraules textuais: (2). «Després de llegir l'article de Barron no vaig poder dormir... Semblava haver-hi una relació entre els illots de Langerhans i la diabetis clínica... No fou fins a les dues de la matinada que vaig poder cristallitzar la idea en una forma que fos susceptible d'experimentació i vaig escriure al meu llibre de notes les paraules següents: "Lligar els conductes pancreàtics de gossos. Esperar de sis a vuit setmanes per la degeneració. Extirpar el residu i extreure". L'endemà al matí... vaig inquirir sobre facilitats per a treball experimental».

La «Western University» no pogué oferir en aquell moment les facilitats necessàries i Banting anà a Toronto a demanar ajut al professor Macleod, cap del Departament de Fisiologia d'aquella Universitat i gran autoritat en el metabolisme dels glúcids. Tornant a paraules textuais de Banting, aquest escriví: «Mai no oblidaré aquesta primera entrevista amb el professor Macleod... perquè al final de l'entrevista el professor em demanà què era el que jo esperava accomplir quan els fisiòlegs més ben preparats no havien pogut establir ni demostrar que hi hagués una secreció interna del pàncreas». Sigui com sigui, algunes setmanes més tard Macleod es decidí a donar a Banting les facilitats que aquest demanava: va oferir-li un petit laboratori, que no estaria però a la seva disposició fins a mitjan maig, amb instruments i altre material de treball quirúrgic i químic; alguns gossos i l'aliment corresponent, i un ajudant ben entrenat en determinacions de glucosa a la sang i a l'orina i en altres tècniques bioquímiques. Aquell ajudant s'escaigué ésser Charles Herbert Best, que en aquella primavera del 1921 acabà els estudis corresponents al grau acadèmic de «Bachelor of Arts» en Fisiologia i Bioquímica. Best havia nascut l'any 1899 a West Pembroke, Maine, Estats Units, tocant a la frontera canadenc, de pares canadencs i de família establerta al Canadà des del 1749. Una germana del seu pare havia mort tot just de diabetis, i aquesta circumstància havia despertat també en el jove estudiant un especial interès per aquesta malaltia. Això féu que, quan Macleod demanà un voluntari entre els seus alumnes per a treballar com a ajudant de Banting, Best s'offerís i fos acceptat. D'aquesta manera fou constituït l'equip Banting i Best (fig. 3).

B) EL DESCOBRIMENT

El treball experimental començà el 16 de maig de 1921. De primer Banting i Best lligaren els conductes pancreàtics d'uns quants gossos i després en pancreatectomitzaren uns quants més per tal de familiarit-

zar-se amb el que succeís amb el sucre a la sang i a l'orina, amb l'estat general dels animals, i amb qualssevol altres detalls que poguessin ésser interessants, abans i després de l'operació.

Des del 16 de maig fins ben entrat el setembre els dos joves investigadors treballaren sols sense cap altre cooperador ni conseller i sense cap ajut de personal subaltern: ells mateixos s'hagueren d'ocupar d'alimentar els animals, tenir-los nets, dur-los de les gàbies al lloc de treball i tornar-los a les gàbies, rentar tot el seu material de treball, mantenir net el laboratori, disposar de les escombraries de tota mena, etc.

El dia 6 de juliol sofriren el seu primer contratemps. En obrir el ventre dels dos primers gossos operats de lligadura dels conductes excretors trobaren que aquests no estaven totalment obstruïts i els pàncreas no estaven degenerats. Sense desencoratjar-se, decidiren d'operar novament els animals ja operats que calgués per tal d'assegurar-se que noves lligadures donessin els resultats desitjats. Des del dia 27 del mateix mes disposaren de gossos amb atròfia pancreàtica satisfactòria i aquell mateix dia extirparen un d'aquests pàncreas amb degeneració del teixit acínic i en feren el seu primer extret mig congelant-lo i movent-lo amb sorra; feren l'extracció amb uns 100 cc de solució de Ringer, que deixaren macerar algun temps i, finalment, filtraren per paper. Tot el material emprat era rigorosament net i havia estat prèviament refredat a temperatura bastant baixa. L'extret així preparat fou conservat a la nevera fins al moment d'usar-lo; abans d'injectar-lo fou portat a 37° aproximadament.

El primer experiment amb aquell extret —preparat segons la idea que Banting havia concebut sense saber que Ssobolew l'havia suggerit 19 anys abans— fou dut a terme el dia 30 de juliol, amb resultat no pas gaire brillant però indubtablement positiu i francament encoratjador. Per aquest resultat, per l'encoratjament que en reberen els autors de l'experiment i per les conseqüències que, com veurem tot seguit, resultaren d'aquest encoratjament, la data del 30 de juliol de 1921 mereix d'ésser recordada com una fita transcendental en la història de la Fisiologia i més àmpliament de la Medicina. Aquell dia dues injeccions intravenoses d'uns 4 o uns 5 cc de l'extret amb intervals d'una hora feren baixar el sucre de la sang d'un gos en dejú, que havia estat pancreatectomitzat 12 dies abans, de 200 a 110, és a dir, 90 mg per 100 cc.

Encoratjats, doncs, pel resultat del seu primer experiment, des de primers d'agost Banting i Best treballaren incansablement, algunes vegades dia i nit, menjant i dormint poc o molt al laboratori (86, pàg. 66), amb resultats en conjunt satisfactoris. Per exemple, en un full d'un llibre de notes (fig. 4), hom pot veure que un gos que a mitjanit del 6 al 7 d'agost tenia una glucèmia de 430 mg % i una relació G/N a l'orina

de 2,8, típica d'una diabetis pancreopriva greu, per efecte de 3 injeccions intravenoses de l'extret de pàncreas degenerat —que llavors en deien *isletin*— amb intervals d'una hora, la glucèmia baixà a 290, és a dir, 140 mg % en 3 hores. El dia 14 d'agost obtingueren llur primera hipoglucèmia, la qual fou provocada deliberadament, com ho demostra el passatge següent del llibre de notes corresponent a aquella data: (86, pàg. 70): «Fou decidit d'indagar si una sobredosi de l'extret reduiria el sucre de la sang del gos 92 per sota del nivell normal de 0,90 %». I, en efecte, en aquest gos, pancreatectomitzat el dia 11 d'agost, la glucèmia, malgrat repetides injeccions de 5 i 8 cc d'*isletin*, el dia 12 havia arribat a 300 mg %; tanmateix, després de noves injeccions de dosis més altes, el dia 14 baixà a 69 mg %.

No tots els resultats d'aquesta primera etapa foren encoratjadors i alguns haurien pogut desencoratjar investigadors menys entusiastes. Els entrebancs, però, estimularen Banting i Best a cercar i tractar de corregir les causes dels fracassos i els portaren a fer un gran nombre d'experiments amb algunes modificacions del procediment original de preparació dels extreus de pàncreas degenerat. Tractaren de precisar la influència de diferents factors sobre l'eficàcia dels extreus, assajaren diferents vies d'administració i feren també experiments de control per tal de verificar si els efectes favorables de la major part dels extreus assajats podien o no ésser deguts a algun factor altre que l'acció d'una secreció interna del pàncreas. Des de mitjan setembre els joves investigadors havien comptat amb l'encoratjament de Macleod, retornat de les seves vacances, l'interès d'altres membres del Departament de Fisiologia i l'ajut físic d'algun personal subaltern.

La primera notícia més o menys pública de les seves troballes fins a mitjan novembre de 1921 foren donades per Banting i Best en una reunió del «Physiological Journal Club» de la Universitat de Toronto el dia 14 d'aquell mes, amb un públic constituït exclusivament per professors i estudiants del Departament de Fisiologia. Els mateixos resultats foren presentats per Macleod davant un públic molt més ampli al final de desembre del mateix any a la trenta-quatrena reunió anual de l'«American Physiological Society» a la Universitat de Yale, a New Haven, i foren resumits com segueix en una breu nota signada per Banting, Best i Macleod publicada el mes de gener de 1922 (5): «Aquest extret neutre o lleugerament acidificat injectat intravenosament o subcutàniament causa invariablement una marcada reducció del sucre de la sang de gossos amb diabetis pancreopriva i de la quantitat de sucre eliminat per l'orina. Extreus de fetge i de melsa i extreus bullits de pàncreas no són eficaços. Ulteriors investigacions han demostrat el que segueix: a) la incubació de l'extret en solució alcalina durant dues ho-

res amb suc pancreàtic suprimeix l'efecte hipoglucemiant; b) glucosa donada intravenosament o per «os» és retinguda pels animals diabètics si també són administrades dosis adequades de l'extret; c) les determinacions d'hemoglobina abans i després de l'administració de l'extret donen resultats idèntics; d) l'extret neutre guardat en fred reté la seva potència almenys durant set dies; les injeccions subcutànies tenen un efecte menys ràpid però més prolongat. Les injeccions rectals no són eficaces. Els experiments han estat repetits en 10 animals, alguns del quals foren observats durant més de dues setmanes.»

Ni el resum transcrit ni les conclusions semblants d'un extens article publicat per Banting i Best el mes de febrer de 1922 (3) no fan referència a d'altres experiments que de fet foren també duts a terme en la mateixa primera etapa que acabà a mitjan novembre de 1921. En aquells experiments Banting i Best assajaren extrems, sempre exclusivament en solució de Ringer neutra o lleugerament acidificada o alcalinitzada, de pàncreas total, no degenerat, de gos o de gat (pàncreas normal) i de pàncreas tampoc no degenerat però que havien tractat d'alliberar exhaustivament del seu contingut de suc pancreàtic mitjançant continuades injeccions de secretina i repetides estimulacions vagals practicades al gos abans de treure-li el pàncreas (pàncreas exhaurit). Amb els extrems neutres o lleugerament acidificats de pàncreas exhaurit preparats en el seu primer intent obtingueren resultats tan bons o millors que amb els millors extrems de pàncreas degenerat. En els intents següents és probable que no fos aconseguit un veritable exhauriment, i el fet és que l'efecte antidiabètic fou molt petit i acompanyat d'efectes secundaris indesitjables. Els efectes dels extrems de pàncreas normal foren molt semblants als dels de pàncreas no totalment exhaurit, i els efectes indesitjables foren especialment marcats amb els extrems de pàncreas de gat.

Les darreres paraules —abans de les conclusions— de l'article del febrer de 1921 de Banting i Best (3, pàg. 265) foren: «... és molt obvi que els resultats del nostre treball experimental publicats en aquest article no justifiquen pas en el moment actual l'administració terapèutica d'extrems de glàndula degenerada a casos de diabetis sacarina en la clínica». Banting i Best s'adonaren que no es podia pas esperar que mètodes que compreguessin passos tals com la lligadura de conductes excretors i la consegüent espera de la degeneració del pàncreas o l'exhauriment de la glàndula per maniobres com les abans esmentades poguessin ésser emprats en el tractament de milions de diabètics, i això els decidí a cercar altres camins.

El primer dels nous camins assajats per Banting i Best fou també, no pas idèntic, però sí molt semblant al segon dels dos que havien

estat suggerits per Ssobolew el 1902 (83). En la introducció del treball en què Banting i Best descriuen pel maig de 1922 els experiments de la segona etapa del seu treball, començada el mes de novembre de 1921, hom pot llegir el que segueix: «Ibrahim (1909) no pogué obtenir proves conclusives de presència d'un enzim proteolític en el pàncreas de fetus humans fins després del quart mes de la vida intrauterina. Carlson (1911) trobà que en gosses pròximes al terme de llur gravidesa la pancreatectomia no era seguida de glucosúria greu fins després del naixement dels cadells. La interpretació més natural de l'experiment de Carlson és que el pàncreas del fetus forneix a la mare la secreció interna necessària per al metabolisme del sucre. Aquests fets, juntament amb les proves fornides pels nostres experiments previs, suggeriren la possibilitat que el pàncreas fetal pogués éser font d'un extret ric en secreció interna i lliure, però, dels enzims destructius del suc pancreàtic». En un article sobre història de la insulina publicat el 1929, Banting (2) explica textualment: «La primera idea fou d'extreure el pàncreas d'animals nats de poc.» És a dir, exactament la idea suggerida per Ssobolew el 1902. Banting, però, modificà aquesta idea, ja que immediatament després de les paraules transcrites escriví: «Semblava raonable de concloure que el pàncreas d'un fetus mig desenvolupat pogués contenir quantitats encara més grans de cèl·lules insulars... Al mateix temps sembla raonable de concloure que, atès que la digestió no és cridada a actuar fins després del naixement de l'animal, en el fetus no hi hauria pas substàncies digestives poderoses. Havent nascut i crescut en una granja i estant familiaritzat amb la cria de bestiar, jo sabia que les vaques destinades a produir carn, per tal de fer aquesta més nutritiva eren prenyades abans d'engreixar-les. Per consegüent, als escorxadors hi hauria abundància de fetus de vedell disponibles. L'endemà a les 9 del matí Mr. Best i jo anàrem a l'escorxador i n'obtinguérem nou, de tres a cinc mesos de gestació.»

El primer extret de pàncreas fetal fou preparat pel mateix mètode dels primers extrems de pàncreas degenerat. Tant el primer experiment d'injecció d'aquest extret a un gos pancreatectomitzat com molts d'altres que el seguiren amb extrems semblants donaren resultats tan o més bons que els millors obtinguts abans amb extrems de pàncreas degenerat. Banting i Best s'adonaren, però, que també aquest nou camí resultaria poc pràctic per a tractar en el futur milions de diabètics humans. Llavors pensaren en la possibilitat que fent una primera extracció amb alcohol de graduació adequada seria possible d'emprar pàncreas normal d'animals adults, molt més fàcil de trobar en quantitats pràcticament il·limitades. L'alcohol eliminaria l'acció pertorbadora dels enzims pancreàtics i la major part de les proteïnes, lípids i altres substàncies sen-

se acció antidiabètica i possibles causants d'efectes secundaris indesitjables. L'extret alcohòlic seria després dessecat mitjançant un corrent d'aire calent o a pressió baixa, i el residu sec seria dissolt o suspès o emulsionat en aigua o en alguna solució salina.

El nou mètode a base d'extracció inicial amb alcohol fou primer assajat amb pàncreas fetal i donà resultats millors que amb qualsevol altre dels extrems anteriors. Llavors fou assajat amb pàncreas normal d'animals adults, amb resultats igualment bons. Des de mitjan novembre, Banting i Best dugueren a terme un gran nombre d'experiments assajant diferents concentracions d'alcohol, diferents nivells de pH, diferents diluents aquosos i diferents concentracions finals, i alguna altra modificació del mètode d'extracció. Una altra vegada assajaren diferents vies d'administració i feren nous experiments de control amb extrems de fetge, melsa, tiroide i timus. També, en la preparació de pàncreas normal, assajaren l'ús d'acetona, cloroform i èter en diferents etapes del procés. D'aquesta manera comprovaren novament l'especificitat de l'acció antidiabètica dels extrems de pàncreas, precisaren alguns factors favorables per a l'obtenció d'extrems actius de pàncreas normal d'animals adults i eliminaren alguns dels factors adversos. De tot això resultaren llargues supervivències de gossos pancreatectomitzats, lliures de símptomes perceptibles de diabetis mentre no s'interrompia l'administració de quantitats suficients d'extrems actius. Si no era per aquest motiu, els animals no morien pas de la diabetis, sinó que foren sacrificats per tal d'ésser autopsiats amb l'objecte de verificar si la pancreatectomia havia estat efectivament total. Així fou com una gossa totalment pancreatectomitzada, coneguda amb el nom de *Marjorie* (fig. 5), visqué 70 dies des de la pancreatectomia fins a l'autòpsia, malgrat haver estat repetidament utilitzada per a experiments amb diferents extrems, alguns del quals resultaren inactius o poc eficaços, i haver-hi hagut també algunes curtes interrupcions en el tractament.

Banting i Best cregueren finalment arribat el moment d'intentar l'ús de llur *isletin* en el tractament de diabètics humans. Amb aquest objecte, cap a la fi de desembre prepararen un extret de pàncreas normal de bou adult i, després d'haver-lo assajat en animals diabètics per tal de formar-se alguna idea de la seva potència i assegurar-se de l'absència d'efectes secundaris greus, se n'injectaren al braç, subcutàniament, l'un a l'altre, petites quantitats. Les injeccions els produïren inflor i vermellor locals lleugeres i una mica de dolor que trobaren tolerable.

C) ELS PRIMERS MESOS DE LA INSULINOTERÀPIA

El primer diabètic humà tractat amb el que encara hom en deia *isletin* fou Leonard Thompson, de 14 anys, hospitalitzat a l'Hospital Ge-

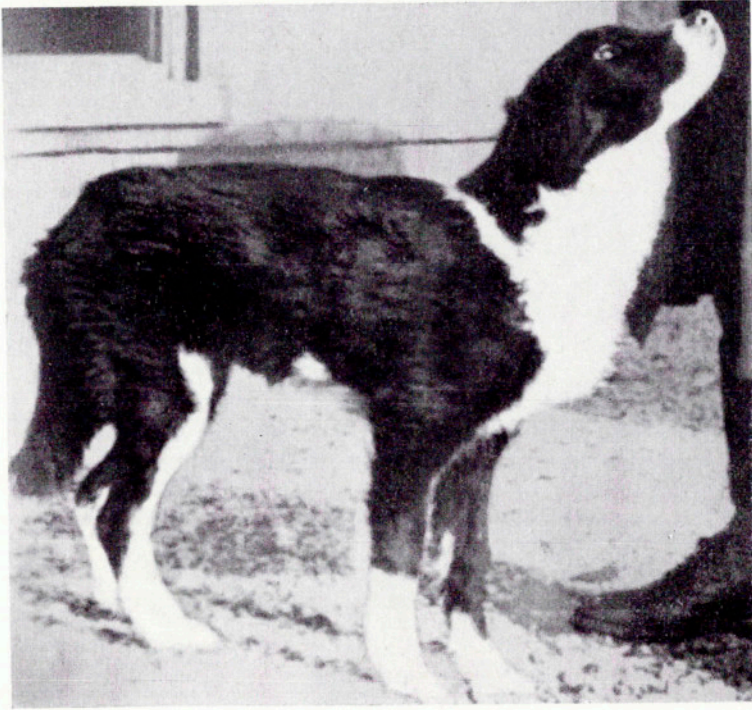


FIG. 5. La gossa diabètica per pancreactomia anomenada *Marjorie*, tractada amb el que llavors en deien *isletin*. Aquest tractament la mantingué viva, i la major part del temps en molt bon estat, durant 70 dies des de la primera injecció fins que fou sacrificada per a ésser autopsiada. — Fotogratat del llibre *The Story of Insulin* (87).



FIG. 6. Leonard Thompson. Primer diabètic humà tractat amb insulina (vegeu text). — Fotogratat d'un article de Best (8).

neral de Toronto en estat molt greu. El metge que administrà les primeres injeccions fou el Dr. Walter Campbell, i la data de la primera injecció fou el dia 11 de gener de 1922. El resultat d'aquella injecció des del punt de vista de les manifestacions químiques de la diabetis fou un ràpid i considerable descens de la glucèmia seguit d'una minva així mateix considerable de la glucosúria, però hi hagué reacció local d'inflor, vermellor i dolor tan intensa que obligà a suspendre les injeccions fins que estigué llest un nou extret que fou més ben tolerat. A partir de llavors el malalt millorà ràpidament des de tots els punts de vista i visqué en estat força satisfactori fins que al cap de 10 anys morí de resultes de lesions rebudes en un accident de moto.

Des del mateix gener de 1922 començaren d'ésser tractats altres malalts amb resultat molt bo quant a la malaltia i a l'estat general, però sovint amb reaccions locals massa molestes degudes a impureses dels extrems, i algunes vegades calia interrompre els tractaments per manca temporal d'extrems actius les injeccions dels quals fossin tolerables. Això féu que el Dr. J. B. Collip, professor de bioquímica a la Universitat d'Edmonton, fos encarregat de tractar de trobar la manera d'obtenir extrems actius lliures d'impureses. Aquest resultat fou aviat aconseguit, no pas totalment, però sí en mesura suficient per a fer possible el tractament sense reaccions locals ni generals intolerables. Els extrems preparats per Collip foren cada cop menys impurs i més potents per unitat de volum. Collip trobà també una manera fàcil i relativament precisa de mesurar la potència dels extrems mitjançant assaigs amb conills normals, cosa que va fer possible d'ajustar els extrems dels diferents lots successius a una potència per centímetre cúbic aproximadament uniforme. Aquesta potència fou, de primer, expressada en el que se'n deien «unitats conill» o «unitats fisiològiques», les quals foren aviat subdividides en tres «unitats clíniques». Les actuals unitats internacionals foren creades molt més tard. Quan Collip intentà de passar a la producció a gran escala, es trobà amb greus dificultats i, com que el nombre de malalts tractats havia augmentat molt, novament hi hagué interrupcions del tractament. Justament llavors Collip hagué de marxar de Toronto per a reincorporar-se al seu lloc a la Universitat d'Edmonton, i la tasca de continuar millorant la qualitat dels extrems i produir-los en escala relativament gran fou encomanada als «Connaught Laboratories» de la Universitat de Toronto, amb Best com a director de la producció dels extrems, amb la col·laboració poc després del bioquímic D. S. Scott. Pel maig de 1922 la producció d'extrems era ja regular, sense interrupcions, i prou abundant perquè al Canadà es contessin ja per centenars els diabètics tractats amb magnífics resultats. En aquell mes de maig, i per iniciativa del professor Macleod, el nou *isletin* fou canviat per

la denominació *insulin*, per a nosaltres «insulina». Aquesta nova denominació fou creada ignorant que una sola lletra la diferenciava de la denominació *insuline* que havia estat proposada per Schäfer el 1916 per a la llavors hipotètica secreció interna del pàncreas, quan també aquest autor ignorava que la mateixa denominació havia estat proposada per Meyer el 1909. Tot això fou àmpliament conegut només quan el mateix Schäfer ho comentà en un seu llibre publicat l'any 1926 (77).

Poc després la producció a gran escala als Estats Units fou confiada a l'Eli Lilly Company, d'Indianàpolis, els tècnics de la qual, sota la direcció del Dr. G. H. A. Clowes, contribuïren molt a la progressiva purificació de la insulina. El Dr. Joslin, de Boston, fou el primer a tractar diabètics amb insulina als Estats Units, començant el mes d'agost de 1922. Algunes setmanes després començaren la preparació i l'ús terapèutic de la insulina a la Gran Bretanya. Al final de setembre fou preparada insulina en molt petita escala a Barcelona, on fou usada terapèuticament des del dia 4 d'octubre del mateix any 1922 (18). Segons les dades publicades, la preparació d'insulina i el seu ús terapèutic en altres països d'Europa començaren els primers mesos de 1923 (86, pàgina 96).

Els fets importants que succeïren durant els primers mesos de 1922 relacionats amb la insulina no es limiten pas al tractament reeixit d'un nombre creixent de malalts, al millorament progressiu de la qualitat del nou medicament i a l'augment de la seva producció. Des que els primers resultats clínics feren indubtable la importància pràctica del descobriment de Banting i Best, el professor Macleod s'adonà de la necessitat que fossin estudiats a fons nombrosos problemes relacionats amb la insulina, uns de transcendència pràctica immediata i altres de significació científica, els quals, ultra llur valor des d'aquest punt de vista, podrien esdevenir també d'importància pràctica. Això féu que l'esmentat cap del Departament de Fisiologia de la Universitat de Toronto deixés de banda altres problemes en què estava interessat i es posés ell i posés gairebé tots els investigadors del seu Departament, juntament amb Banting i Best, a treballar sota la seva direcció en diferents projectes de recerca relacionats amb aspectes clínics, bioquímics i fisiològics de la insulina. Per als aspectes clínics hi hagué una estreta col·laboració entre Banting i Best, Collip, els investigadors del Departament de Fisiologia i els doctors W. R. Campbell, A. A. Fletcher, E. C. Noble i altres metges del Toronto General Hospital i dos altres hospitals de Toronto. Els resultats, molt valuosos, d'aquests treballs d'àmplia col·laboració sota la direcció general de Macleod, afegits als assolits per Banting i Best mentre treballaren ells dos sols el 1921, feren que el Premi Nobel de Fisiologia i Medicina del 1923 fos atorgat conjuntament

a Banting i a Macleod, els quals, noblement, cediren la meitat de les parts respectives de l'import monetari del premi, el primer a Best i el segon a Collip.

A les acaballes de l'estiu de 1922 la denominació «insulina» fou registrada i els principis fonamentals del mètode de preparació de la insulina foren patentats a nom de la Universitat de Toronto. Aquestes mesures legals foren preses exclusivament amb la finalitat de protegir els futurs malalts que haurien d'ésser tractats amb el nou medicament contra abusos del nom i del mètode que poguessin intentar de cometre industrials i comerciants poc escrupolosos. Mai ni la Universitat de Toronto ni els descobridors de la insulina no reberen ni la més petita quantitat de diners en concepte de drets derivats de l'esmentada protecció legal. Amb l'objecte de fer efectiva aquesta protecció, el 1923 la Universitat de Toronto delegà els seus drets a uns «Comitès de la Insulina» que foren creats a diferents països; per exemple, a més d'un «Insulin Committee of the Governors of the University of Toronto», tinc coneixement, concretament, del Comitè de la insulina d'Alemanya, presidit pel professor Oscar Minkowski, i del d'Espanya, presidit pel professor August Pi i Sunyer, del qual també formàvem part el professor Jesús Maria Bellido i jo. Aquests Comitès concedien gratuïtament permisos d'ús del nom i del mètode de preparació de la insulina a qualsevol persona o entitat que sotmetés el seu producte al control bacteriològic i farmacològic del Comitè, si el resultat dels assaigs practicats per aquest eren satisfactoris. Quan pocs anys després l'ús de la insulina s'hagué estès per tot el món i metges i malalts estigueren en situació de no poder ja ésser enganyats sobre allò que realment fos insulina, l'actuació dels Comitès de la insulina esdevingué innecessària i aquells organismes deixaren pràcticament d'existir.

L'ús clínic de la insulina serà més àmpliament comentat en l'acte de demà a l'Acadèmia de Medicina.

BIBLIOGRAFIA

1. Ausset, N.: Traitement du diabète pancréatique par l'ingestion de pancréas de veau. *Semaine méd.*, 1895, 15: 376.
2. Banting, F. G.: The history of insulin. *Edinburgh med. J.*, 1929, 36: 1.
3. Banting, F. G. i C. H. Best: The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. & clin. med.*, 1922, 7: 251.
4. Banting, F. G. i C. H. Best: Pancreatic extracts. *J. Lab. & clin. med.*, 1922, 7: 464.
5. Banting, F. G., C. H. Best i J. J. R. Macleod: The internal secretion of the pancreas. *Am. J. Physiol.*, 1922, 59 (Proceedings, Dec. 1921: 479).

6. Barron, M.: The relation of islets of Langerhans to diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis. *Surgery, Gynecol. & Obstetrics*, 1920, 31: 437.
7. Battistini, F.: Über zwei Fälle von Diabetes mellitus mit Pankreas behandelt. *Therap. Monatsch.*, 1893, 7: 494.
8. Best, C. H.: Insulin and diabetes. The present position. The fight against disease, 1933, 26, n.º 3.
9. Bérard i Colin: Mémoire sur les effets de l'extirpation du pancréas. *Gazette hebdomadaire de méd. et chir.*, 1858, 5: 59.
10. Bernard, C.: *Leçons de Physiologie expérimentale*, vol. 2, París, 1856, pàg. 274.
11. Blumenthal, F.: Über Organsafftherapie bei Diabetes mellitus. *Zeitschr. f. diätet. u. physic. Therap.*, 1898, 1: 250.
12. Borman: Case of therapeutic use of pancreas. *Wien. med. Bl.*, 1895, 18: 663.
13. Bouchardat, A.: *De la glycosurie ou diabète sucré*. París, Germer-Ballière, 1875.
14. Brunner, J. C. von: *Experimenta nova circum pancreas*. Amstelodami, apud H. Westenium, 1683.
15. Capparelli, A.: Zur Frage des experimentellen Pankreasdiabetes. *Biol. Centralbl.*, 1893, 13: 495.
16. Carlson, A. J. i F. M. Drennan: The control of pancreatic diabetes in pregnancy by the passage of the internal secretion of the pancreas of the fetus to the blood of the mother, *Am. J. Physiol.*, 1912, 28: 391.
17. Carlson, A. J. i H. Ginsburg: The influence of blood transfusion on the hyperglycemia and glycosuria of pancreatic diabetes in the dog. *Am. J. Physiol.*, 1915, 36: 280.
18. Carrasco-Formiguera, R.: Insulin and diabetes. *Brit. med. J.*, 1922, ii: 1143.
19. Clark, A. H.: The interrelation of the surviving heart and pancreas of the dog in sugar metabolism. *J. exp. med.*, 1916 24: 621.
20. Clark, A. H.: The interrelation of the surviving heart and pancreas of the dog in sugar metabolism (2nd paper). *J. exp. med.*, 1917, 26: 721.
21. Clark, A. H. The interrelation of the surviving heart and pancreas of the dog in sugar metabolism. *Johns Hopkins Hospital Rep.*, 1919, 18: 229.
22. Conheim, O.: Ueber Kohlenhydratverbrennung. 2 Mitteilung. Die activierende Substanz des Pankreas. *Zeitschr. f. Physiol. Chem. (Strassburg)*, 1904, 42: 401.
23. Cawley, C. A.: Singular case of diabetes, Consisting entirely in the quality of the urine; with an inquiry into the different theories of the disease. *London med. J.*, 1788, 9: 286.
24. Crofton, W. M.: Pancreatic secretion in the treatment of diabetes. *Lancet*, 1909, i: 607.
25. Crofton, W. M.: A new pancreatic extract for the treatment of diabetes. *Dublin J. med. & surg.*, 1910, 129: 332.
26. D'Arnozan i Vaillard: Contribution à l'étude du pancréas du lapin: lésions provoquées par la ligature du canal de Wirsung. *Archives de Physiol. norm. et Pathol.* 1884, 3: 287.
27. De Dominicis, N.: II diabete succherino sperimentale attento in animali in conseguenza dell'ablazione del pancreas. *Bull. d. r. Accad. med. chir. di Napoli*, 1889, 1: 117.
28. Diamare, V.: Studii comparativi sulle isole di Langerhans del pancreas. *Internat. Monatschr. f. Anat. u. Physiol.*, 1889, 16: 155.
29. Diamare, V. i A. Kuliako: Zur Frage nach der physiologischen Bedeutung der Langerhanschen Inseln im Pankreas. *Vorläufige Mitteilung. Zentralbl. f. Physiol.* 1904, 18: 432.
30. Drennan, F. M.: The presence of the internal secretion of the pancreas in the blood. *Am. J. Physiol.*, 1911, 28: 396.
31. Forschbach, J.: Versuche zur Behandlung des Diabetes mellitus mit dem Zuefzerschen Pankreashormon. *Deutsche med. Wchnschr.*, 1909, 35: 2053.

32. Gley, E.: Action des extraits du pancréas sclérosé sur les chiens diabétiques (par extirpation du pancréas). *Compt. rend. Soc. de biol.*, 1922, 87: 1322.
33. Haller. Citat per Bouchardat (13).
34. Hédon, E.: Greffe sous-cutanée du pancréas; ses résultats au point de vue de la théorie du diabète pancréatique. *Compt. rend. Soc. de biol.*, 1892, 44: 678.
35. Houssay, B. A.: The discovery of pancreatic diabetes. The role of Oscar Minkowski. *Diabetes*, 1952, 1: 112.
36. Kaminura, N.: Über die Bedeutung der Langerhanschen Inseln für den Kohlenhydratstoffwechsel. I. Das Verhalten des Blutzuckers nach Unterbindung des Ductus pancreaticus bei Kaninchen. *Mitt. a. d. med. Fakult. d. k. Univ. zu Tokyo*, 1917, 17: 95.
37. Klebs, E. i P. Munk: Tageblatt der 43 Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Innsbruck. 1869. Citats per von Mering i Minkowski (56, pàg. 373).
38. Kirkbride, M. D.: The islets of Langerhans after ligature of the pancreatic ducts. *J. exp. med.*, 1912, 15: 101.
39. Kleiner, I. S.: The action of intravenous injections of pancreas emulsions in experimental diabetes. *J. biol. chem.*, 1919, 40: 153.
40. Kleiner, I. S. i S. J. Meltzer: Retention in the circulation of glucose in normal and depancreatized animals, and the effect of an intravenous injection of an emulsion of pancreas upon this retention. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1915, 1: 338.
41. Kühne, V. i A. S. Lea: Beobachtungen über die Absonderung des Pankreas. *Untersuch. a. d. physiol. Inst. d. Univ. Heidelberg*, 1882, 2: 448.
42. La Barre, J.: Contribution à l'étude des variations physiologiques de la sécrétion interne du pancréas. I. Démonstration de l'existence d'une insulïnémie physiologique. *Archives intern. de Physiol.*, 1927, 29: 227.
43. Laguesse, M. E.: Sur la formation des îlots de Langerhans dans le pancréas. *Comp. rend. Soc. biol.*, 1893, 45: 819.
44. Lancereaux, E.: Notes et réflexions à propos de deux cas de diabète sucré avec altération du pancréas. *Bull. Acad. Méd., Paris*, 1877, 6: 1108.
45. Lancereaux, E.: Nouveaux faits de diabète sucré avec altération du pancréas. *Bull. Acad. Méd. Paris*, 1888, 2 série, 19: 588.
46. Lancereaux, E. et A. Thiroloix: Le diabète pancréatique. *Comp. rend. Acad. Sc. Paris*, 1892, 115: 341.
47. Langerhans, P.: Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse. *Disertation*. Berlin: G. Lange, 1869.
48. Lépine, S.: Rapports entre le diabète et les lésions du pancréas. *Nouvelle théorie du diabète*. Lyon méd., 1889, 62: 620.
49. Lissler: Citat per Oser: *Erkrankungen des Pankreas*, en Nothangel: *Handbuch d. spez. Pathol. u. Therap.*, vol. 18: 126, 1898.
50. MacCallum, W. G.: On the relation of the islands of Langerhans to glycosuria. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1909, 20: 265.
51. Mackenzie, H. W. G.: The treatment of diabetes mellitus by means of pancreatic juice. *Brit. med. J.* 1893, i: 63.
52. Mackenzie-Wallis, R. L.: The internal secretion of the pancreas and its application to the treatment of diabetes mellitus. *Lancet*, 1922, ii: 1158.
53. Mankowski, A.: Nouvelles données sur la microphysiologie des îlots de Langerhans. *Comp. rend. d. XIII Cong. intern. de Méd., Sec. d'Anat. pathol. (Paris, 1900)*, pàg. 302, 1901.
54. Martinotti. Citat per von Mering i Minkowski (56, pàg. 374).
55. Mering, J. von, i O. Minkowski: Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Centralbl. f. Klin. Med.*, 1889, 10: 393.
56. Mering, J. von, i O. Minkowski: Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. (Leipzig)*, 1889-1890, 26: 371.
57. Minkowski, O.: Diabetes mellitus und Pankreas Affection. *Berl. klin. Wchnschr.*, 1890, 27: 167.

58. Minkowski, O.: Ueber die Falgen partieller Pankreasextirpation. *Centabl. f. klin. Med.*, 1890, *11*: 81.
59. Minkowski, O.: Untersuchungen über den Diabetes mellitus nach Extirpation des Pankreas. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. (Leipzig)*, 1892, *31*: 85.
60. Minkowski, O.: Weitere Mitteilungen über den Diabetes mellitus nach Extirpation des Pankreas. *Berl. klin. Wchnschr.*, 1892, *29*: 90.
61. Minkowski, O.: Die Totalexstirpation des Duodenums. *Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. (Leipzig)*, 1907-1908, *58*: 271.
62. Murlin, J. R.: Properties and methods of preparation of the anti-diabetic substance (glucopyron) generated by the pancreas. *Proced. Soc. exper. biol. & med.*, 1922-1923, *20*: 70.
63. Murlin, J. R. i B. Kramer: The influence of pancreatic and duodenal extracts on the glycosuria and the respiratory metabolism of depancreatized dogs. *J. biol. chem.*, 1913, *15*: 365.
64. Murlin, J. R. i B. Kramer: Pancreatic diabetes in the dog. I. Influence of alkali and acid upon the glycosuria and hyperglycemia. *J. biol. chem.*, 1916, *27*: 481.
65. Murlin, J. R. i B. Kramer: Pancreatic diabetes in the dog. III. The influence of alkali on the respiratory metabolism after total and partial pancreatectomy. *J. biol. chem.*, 1916, *27*: 517.
66. Naunyn, B.: *Erinnerungen, Gedanken und Meinungen*. J. Bergman, München, 1925, pàg. 457.
67. Opie, E. L.: On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to diabetes mellitus. *J. exp. Med.* 1901, *5*: 397.
68. Paulesco, N. C.: Recherche sur le rôle du pancréas dans l'assimilation nutritive. *Archives intern. de Physiol. (Liège)*, 1921, *16*: 85.
69. Paulesco, N. C.: Action de l'extrait pancréatique injecté dans le sang, chez un animal diabétique. *Comp. rend. Soc. biol.*, 1921, *85*: 556.
70. Paulesco, N. C.: Quelques réactions chimiques et physiques appliquées a l'extrait aqueux du pancréas por le débarrasser des substances protéiques en excès. *Archives intern. de Physiol.*, 1923, *21*: 71.
71. Paulesco, N. C.: Divers procédés pour introduire l'extrait pancréatique dans l'organisme d'un animal diabétique. *Archives intern. de Physiol.*, 1923, *21*: 215.
72. Paulesco, N. C.: Traitement du diabète. (Documents établissant la priorité.) *Comp. rend. Soc. biol.*, 1924, *90*: 714.
73. Paulesco, N. C.: Traitement du diabète: *Presse méd.*, 1924, *32*: 202.
74. Rennie, J. and T. Fraser: The islets of Langerhans in relation to diabetes. *Biochem. J.*, 1907, *2*: 7.
75. Sauerbeck, M.: Die Langerhanschen Inseln des Pankreas und ihre Beziehung zum Diabetes mellitus. *Ergeb. d. allg. Path. u. path. Anat.*, 1904, *8*: 538.
76. Schäfer, E. A. S.: On internal secretion. *Brit. med. J.*, 1895, *ii*: 341.
77. Schäfer, E. A. S.: The endocrine organs. 2.^a part. cap. 49. New York, Longmans Green & Co., 1926.
78. Schultze, W.: Die Bedeutung der Langerhanschen Inseln im Pankreas. *Arch. f. mikr. Anat. (Bonn)*, 1900, *56*: 491.
79. Scott, E. L.: On the influence of intravenous injections of an extract of the pancreas on experimental diabetes. *Am. J. Physiol.*, 1912, *29*: 306.
80. Senn. Citat per von Mering i Minkowski (56, pàg. 373).
81. Sibley, W. K.: On the treatment of diabetes mellitus by feeding of raw pancreas. *Brit. med. J.*, 1893, *i*: 579.
82. Ssobolew, L. W.: Über die Structur der Bauchspeicheldrüse unter gewissen pathologischen Bedingungen. *Centralbl. f. allg. Path. u. pathol. Anat.*, 1900, *11*: 202.

83. Ssobolew, L. W.: Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Sekretion der Bauchspeicheldrüse. Virchow's Arch. f. path. Anat. u. Physiol. u. f. klin. Med., 1902, 168: 91.
84. White, W. H. On the treatment of diabets mellitus by feeding raw pancreas and by subcutaneous injection of liquor pancreaticus. Brit. med. J., 1893, i: 452.
85. Wood, N.: The treatment of diabetes by pancreatic extracts, Brit. med. J., 1893, i: 64.
86. Wrenshall, G. A., G. Hetenyi Jr. i W. R. Feasby: The story o finsulin. Londres. The Bodley Head, 1962.
87. Zuelzer, G.: Experimentelle Untersuchungen über Diabetes. Berl. klin. Wehnschr., 1907, 44: 474.
88. Zuelzer, G.: Über Versuche einer spezifischen Fermenttherapie des Diabetes. Ztschr. f. exper. Path. u. Therap., 1908-1909, 5: 307.