

LA INSULINA EN ELS PEIXOS

JOSEP PLANAS I MESTRES

Departament de Fisiologia Animal.
Facultat de Ciències. Universitat de Barcelona.

En el cinquantenari de la descoberta de la insulina que ara commemorem, permeteu-me que sotmeti a la vostra consideració un tema d'endocrinologia comparada, estretament vinculat amb aquella descoberta i, d'altra part, motiu de les meves primeres inquietuds científiques.

L'estudi de la insulina en els peixos, concretament en la tonyina, fou el meu primer treball dut a terme i el seu estudi, anys després, fou l'objecte de la meva tesi doctoral. Tot seguit aquests estudis foren ampliat al pàncreas endocrí d'altres peixos del mateix grup dels escòmbrids.

Des de la meva estada a la Universitat de Valladolid a partir del 1958, la meva dedicació a aquest tema hagué d'ésser necessàriament reduïda, i noves línies d'investigació foren obertes amb material més fàcilment accessible a les possibilitats del moment.

Això no obstant, aquest tema conserva per a mi el mateix atractiu que tenia al principi per al meu esperit il·lusionat amb el seu primer exemple amb el món científic. És per això que, avui, és també un motiu de satisfacció per a mi de recordar aquells dies i aquelles inquietuds en el desinteressat afany de conèixer quelcom més sobre el pàncreas i la insulina en els peixos.

En aquesta comunicació no pretenc de fer una anàlisi històrica sobre el pàncreas endocrí i la insulina en els peixos, sinó, en primer lloc, de fer referència als antecedents concrets per a posar en evidència la vinculació que existeix entre aquest tema i la descoberta de la insulina; en segon lloc, d'exposar de forma resumida la nostra modesta aportació, juntament amb una visió dels aspectes actuals que ens ofereix encara l'estudi del pàncreas o la insulina en els peixos.

I. LES PRIMERES DADES SOBRE EL PANCREAS ENDOCRÍ I LA INSULINA EN ELS PEIXOS

El pàncreas en tots els vertebrats és una glàndula mixta, formada per teixit exocrí, que és majoritari, i uns petits enclavaments de teixit endocrí, identificat des del 1869 per Langerhans en el conill, i coneguts com «illots de Langerhans» des de llavors.

En els peixos ossis o teleostis, aquesta configuració del pàncreas no és general i des de Legouis (1873) hom en distingeixen un petit grup representat per l'anguila, el congre, la morena, etc., que presenten la disposició clàssica denominada per aquell autor «pàncreas compacte», enfront de la resta, que tenen una separació entre ambdós teixits exocrins i endocrins. No obstant això, hom ha format dues categories dintre aquesta tendència a la dispersió del teixit exocrí que hom anomena «pàncreas disseminat» i «pàncreas difús». En el «pàncreas disseminat», el teixit endocrí, que és el que ens interessa especialment aquí, tendeix a reunir-se i a formar els «illots» que són macroscòpics i corresponen a les estructures anatòmiques citades per Stannius i Brockmann el 1846. Aquests «corpuscles de Brockmann», com van ésser anomenats durant molts anys, van ésser equiparats al teixit endocrí dels vertebrats superiors per Diamare (6) i Laguesse (13), amb identificació també dels dos tipus cel·lulars (cèl·lules A i B) per Massari (1898) i un tercer tipus (cèl·lules D) per Bowie (3), molt més tard.

La funció acomplerta pel pàncreas endocrí, o sigui pels illots en els peixos, fou també un misteri fins a la descoberta de la insulina. Així, les primeres dades que en tenim són de Capparelli (5), que assenyala com l'extirpació del pàncreas va seguida d'un augment de l'excreció urinària del sucre, i de Diamare (7), que observa com els extractes dels illots del rap no tenen cap acció hidrolítica sobre el midó.

Els estudis iniciats per Banting i Best el 1920 i dirigits pel Prof. Macleod, que conduïren a la descoberta de la insulina, partiren d'una idea fonamental: la tripsina pancreàtica hauria d'explicar els fracassos en l'obtenció del suposat factor relacionat amb el metabolisme dels glúcids.

Les experiències orientades amb aquest principi, obtenint extreus de pàncreas en diferents condicions (degeneració exocrina per lligada prèvia, esgotament previ del contingut de la tripsina per injecció de secretina o excitació vagal; pàncreas de fetus bovins de 5 mesos, on la secreció externa no és encara evident; tractament àcid dels extreus per a inhibir l'acció proteolítica de l'enzim) conduïren finalment a resultats favorables.

Això no obstant, la prova directa de la localització d'aquest nou factor hormonal en el teixit endocrí fou feta per Macleod (1922, 1923) en demostrar com els illots pancreàtics de diverses espècies de peixos, formats per teixit endocrí exclusivament, produïen una acció hipoglucèmica, mentre que els extrems de teixit exocrí no tenien cap efecte.

Aquests resultats foren ampliat en altres espècies per investigadors també canadencs (8, 23, 24, 41).

En general, les espècies analitzades eren espècies comercials (baccallà, halibut, hipoglòs, rap, etc.) i els rendiments d'insulina oscil·laven entre 15-40 U.I./gr. illot.

McCormick (22) i el mateix Macleod (19) són els primers autors que consideren els peixos com una font d'insulina i fan les primeres consideracions sobre la seva explotació comercial.

L'obtenció de la insulina de mamífer en forma cristallitzada per Abel el 1926, fou posteriorment aconseguida del baccallà per Jense (12) i per Scott (37).

II. INDUSTRIALITZACIÓ I UTILITZACIÓ CLÍNICA DE LA INSULINA DE PEIX

L'aprofitament industrial del peix com a nova font d'insulina fou suggerit per primera vegada pels investigadors canadencs Macleod (19) i McCormick (22), i ocupà l'interès durant uns quants anys, després de la descoberta. Aquest interès inicial sorgí per la major senzillesa en l'obtenció de l'hormona, en tractar, pràcticament, teixit endocrí pur. Això no obstant, quan hom amplià i perfeccionà el mètode d'extracció amb alcohol i àcid clorhídric en fred, assenyalat per primera volta per Banting, Best i Collip, hom pogué obtenir bons rendiments amb pàncreas de mamífers procedents dels escorxadors, especialment bestiar boví.

El procediment en peixos fou aviat rebutjat per antieconòmic, bé que la matèria primera era llençada, però la seva recollecció era molt laboriosa i requeria un personal més especialitzat. Durant alguns anys hom no féu res de nou en aquest sentit fins que la segona guerra mundial provocà una penúria en el forniment d'insulina a Alemanya i al Japó, com a conseqüència de la reducció de les importacions de bestiar boví i de pàncreas aïllats, procedents de l'Argentina, especialment. Al començament del decenni dels anys quaranta foren iniciades a Alemanya, a l'Institut für Meeresforschung de Bremenhaven, les primeres investigacions per a aprofitar el peix procedent de les pesqueries del

Mar del Nord, en especial *Gadus callarias*, *Gadus virens*, *Hippoglossus sp.* i *Molva molva*, *M. vulgaris* (Brandes, 1954). A partir del 1934 hom obté ja els primers resultats satisfactoris, tant per la puresa del producte com per la comprovació del comportament en la clínica humana, que fan que la firma Heinrich Mack Nachf., d'Illestissen Bay, exploti comercialment aquesta font, que en les circumstàncies ocasionades per la guerra resulta rendable. En el període entre 1946 i 1948 la producció és màxima: hom obté anualment 100 milions d'U.I. d'insulina de bacallà a partir de les 120 tones pescades per any (44). La normalització de l'economia alemanya féu que esdevingués cada dia menys rendable aquesta obtenció, en iniciar-se novament la producció de les insulines de mamífer, no solament a Alemanya, sinó en altres països, en especial Dinamarca (firmes Novo i Leo).

La producció al Japó tingué el mateix origen, i allí hom va estudiar i aprofitar especialment els escòmbrids a més d'altres espècies [Tohyama (39), Nagasawa i Kondo (27), Nogi (28)]. Els escòmbrids són, per llur tonatge anual, el grup que hom pesca en més quantitat en aquell país. Tohyama (39) calculen que si fos obtinguda tota la insulina dels exemplars pescats anualment de les espècies (bonítol, seriola i bacallà) hom podria obtenir hormona suficient per a atendre els diabètics del país durant 66 anys. Davant unes perspectives tan favorables, és en aquells anys quan la casa farmacèutica Shimizu llançà al mercat la insulina del bonítol (*Katsuwonus vagans*) [Tateno (38)]. Al Japó, contràriament a Alemanya, la producció d'insulina de peix ha continuat i s'ha convertit en la font principal per al mercat nacional, del qual cobreix el 70 %.

Això no obstant, sembla que, en circumstàncies normals i en països que no tinguin una explotació tan intensa del mar com és el Japó, la utilització dels peixos com a font d'insulina no sembla aconsellable. I, tanmateix, la insulina de peix pot ésser cada dia més utilitzada com un element d'investigació de gran interès en diferents punts que té plantejada la problemàtica endocrinològica del pàncreas, com és ara: l'estructura i la biosíntesi; l'espectre d'acció i l'especificat d'espècie; les resistències immunològiques i el canvi d'insulines d'origens zoològics diferents, etc.

La utilització en clínica humana de la insulina de peix es mostrà favorable des dels primers treballs duts a terme al Canadà. Posteriorment, i com a conseqüència de l'obtenció de tipus industrials a Alemanya i al Japó, hom portà a cap diferents investigacions a ambdós països, com recull Zeile (44) per al primer.

La insulina de peix mostra els efectes fonamentals i propis de totes les insulines de mamífers i és tolerada sense dificultat pels pa-

cients. A pesar d'aquesta uniformitat d'acció general, es demostra que l'espectre d'acció és diferent. Així, per exemple, s'observa que l'efecte és més retardat i durador [Zeile (44)], la qual cosa és ja de fet avantatjosa.

Les insulines de peix poden tenir un nou valor terapèutic en el tractament de diabetis amb resistència deguda a anticossos antiinsulina, car és demostrat que les reaccions immunològiques encreuades entre aquestes insulines i els anticossos humans envers insulines de mamífers són molt dèbils [Yalow i Berson (43)].

III. ELS NOSTRES TREBALLS EN ELS ESCÒMBRIDS

El 1951, fou iniciat l'estudi de la insulina en la tonyina per indicació del Prof. García del Cid, que coneixia l'interès del *Consorcio Nacional Almadrabet* a buscar l'aprofitament màxim d'aquesta espècie. Altres vísceres, com el fetge, ja eran emprades per la indústria farmacèutica par a l'obtenció de vitamina A.

Durant tres anys (1952 a 1955) hom estudià la tonyina que es pescava a l'almadrava de «Cap de Terme» existent, en aquell temps, prop de l'Ametlla de Mar (Tarragona). Els anys 1955 a 1958 fou prosseguit l'estudi en la tonyina atlàntica i amb el bonítol del Nord o albacora. Posteriorment, hom ha portat a cap estudis de tipus principalment microscòpics sobre el pàncreas dels escòmbrids, però aquesta línia d'investigació resta a segon terme perquè em veig obligat a obrir nous camps de recerques més avinents a la meva nova adreça.

Els resultats dels nostres estudis sobre aquesta qüestió foren objecte de publicacions que aparegueren oportunament, i que intentarem ara de resumir.

1) *Insulina.*

Tonyina, Thunnus thynnus, L.

Els antecedents sobre la insulina en els peixos ja han estat exposats inicialment, i, pel que fa a l'espècie escollida (*Thunnus thynnus, L.*), hom tenia dades en la bibliografia a aquest respecte, bé que hom tenia coneixements de la localització d'illots i rendiment d'insulina amb altres espècies pertanyents al grup dels túnnids [Tohyama (39), Nagasawa i Kondo (27)]. Els aspectes histològics, però, havien estat iniciats per altres autors simultàniament als nostres [Lepori (15, 16); Vallmitjana i Gadea (40)].

Hom pogué determinar la situació anatòmica exacta dels principals illots endocrins, així com llur riquesa insulínica, igual que les característiques biològiques més elementals, i els primers resultats foren publicats el 1955 [Planas (29)]. El rendiment amb insulina fou gran: oscil·là, en els diferents extrems obtinguts, entre 140-196 U.I./g illots. Aquest alt rendiment, que destaca fortament dels obtinguts en els pàncreas de mamífers (2 U.I./g pàncreas), és similar als citats per a altres peixos del grup dels túnnyds [Tohyama (39)].

El mètode d'extracció d'insulina emprat, utilitzat després en els altres estudis per la seva senzillesa, fou el de Dudley (1924), i el material era submergit en la solució d'àcid pícric immediatament de pescats i desviscerats els peixos. Aquest procediment conservava el material i precipitava *in situ* la insulina, de manera que sense cap altra precaució podia prosseguir l'extracció en el laboratori, encara que passessin alguns dies després de l'obtenció del material. El preparat d'insulina, un cop convertit en clorhidrat i purificat, era valorat segons el seu efecte hipoglucemiant en conills, enfront de mostres d'insulina cristallitzada Novo seguint el mètode de Marks (21).

Aquesta pauta d'extracció i valoració dels preparats insulínics fou també utilitzada en tots els altres treballs.

Els valors d'insulina obtinguts en els exemplars mediterranis de talles petites (20-50 kg de pes) ens van suggerir la conveniència d'anàlitzar les tonyines atlàntiques, especialment obtingudes en les almadraves andaluses, a fi d'apreciar-ne els rendiments. Per tal motiu ens traslladàrem a Barbate (Cadis), on recollírem dades biomètriques i illots endocrins per a portar a terme les extraccions. Els resultats obtinguts [Planas (32)] ens permeteren d'observar, en general, un menor rendiment en insulina (110-140 U.I./g illots) que en la tonyina mediterrània. Aquesta diferència és atribuïda a l'estat de conservació del material, car ací, per les particulars condicions de pesca, extrèiem els illots i els submergíem en àcid pícric 3 hores després de la mort dels peixos, i l'obtenció de la insulina fou feta després de 15 dies, com a mínim, de restar en aquella solució.

En aquest treball, hom comprovarà com els rendiments dels dos illots principals, que hem anomenat A₁ i B₂, són diferents, i són 110 i 146 U.I./g, respectivament.

Uns estudis histològics posteriors [Planas i Garcia (35)], aplicant la tècnica de tinció de Gomori (hematoxilina cròmica-floxina), ens mostraren com precisament en els illots A₁, les cèl·lules beta, productores d'insulina, són el 20 % enfront del 80 % que presenten les alfa, mentre que en els illots B₁ els percentatges són, respectivament, 36 ± 3 % i 64 ± 4 %.

La relació que hi ha entre el pes dels illots principals i el pes, la talla i la longitud corporal, el pes del fetge, ha estat realitzada amb 66 exemplars (45 mascles i 21 femelles) [Balcells i Planas (2)], i hom ha trobat un pes mitjà d'illots de 1.218 ± 38 mg.

La relació illots/llargada peix, i illots/pes corporal creix fins a uns valors que corresponen a 190 cm i a 120 kg respectivament, per a de créixer tot seguit. El contingut en teixit pancreàtic endocrí per tona ha estat en aquest lot de 9,05 g illots/Tm peix, amb un pes i amb una longitud mitjans de 127,8 kg i 198 cm. En els valors crítics de 190 cm i 120 cm hom calcula un rendiment d'11 g illots per tona.

Aquesta relació haurà d'ésser incrementada quan es tracti d'exemplars que tornin dels llocs de reproducció, dits «de revés», car són de menor pes perquè presenten les gònades buides.

El rendiment amb insulina, per tona, oscil·lava entre 1500-1900 U.I.

Bonítol del Nord. Germa alalunga, Gml.

Aquesta espècie, de distribució universal com l'anterior, ha estat ja objecte d'estudi en aquest sentit per autors japonesos [Nagasawa i Kondo (27)], que assenyalaren una riquesa insulínica de 160 U.I./g illots.

L'interès d'analitzar aquesta espècie era per a nosaltres gran, car el tonatge anual és molt més gran que la tonyina, i ens interessava de comprovar amb el mateix mètode d'extracció que l'utilitzat amb l'espècie precedent.

Els continguts en insulina obtinguts per nosaltres foren de 148-162 U.I./g illots, que coincideixen amb els autors japonesos.

Hom ha trobat també diferents illots en aquesta espècie; però, a causa de la seva menor talla, solament n'ha estat extirpat l'equivalent a l'illot B₁ de la tonyina. Ha estat trobada (Balcells i Planas, 1958) una relació entre el pes de l'illot i el pes corporal o talla, i hom ha calculat aquesta relació, que correspon a l'equació:

$$\text{Pes illot} = 66 \times 10^{-7} \times \text{Pes total}$$

El rendiment d'illots per tona és de 13 g/Tm en el lot estudiat, i hom considera que amb talles superiors pot arribar a 14 g/Tm. Expressat el rendiment amb insulina, dóna valors de 2.200 U.I./Tm peix, que està també d'acord amb els autors japonesos (Nagasawa i Kondo, 1942).

El volum de pesca a l'Estat espanyol amb referència als principals escombrids (túnnids i bonítols) fou analitzat utilitzant les estadístiques de pesca corresponents al decenni 1946-1955. Aquest estudi comprengué l'anàlisi individual de les diferents espècies i de les regions marítimes [Planas i Balcells (2)]. Les possibilitats d'utilització de la pesca

dels escòmbrids en el nostre país foren considerades en una publicació a part [Planas Mestres (31)], on es relacionen els rendiments d'illots per tona de pesca amb la riquesa insulínica en cada espècie i el seu volum anual de pesca.

La utilització de la pesca de tonyina i bonítol, amb valors mitjans sobre 10 anys d'observació, d'11.770 Tm i 14.000 Tm anuals, podria ésser de 45,6 milions d'U.I. per any.

L'aprofitament conjunt amb els altres escòmbrids amb unes 37.850 tones mètriques podria representar uns 64,5 milions d'U.I. Aquesta quantitat permetria de tractar més de 8.000 diabètics l'any.

2) *Glucagon*.

La segona hormona pancreàtica, produïda per les cèl·lules alfa, es posa en evidència pel seu efecte hiperglucemiant i acompanya i impurifica la insulina.

Els primers resultats citats en aquest respecte han estat, al nostre entendre, els d'Audy i Kerly (1) en extrets d'illots de rap (*Lophius piscularius*) i els de Mialhe (26) amb illots de bonítol (*Thunnus germon*) i els de Malandra i Mosca (20) en illots de *Scorpaena scropha*.

Els nostres primers estudis sobre aquesta hormona foren duts a terme conjuntament amb els treballs sobre la insulina. Hi observàrem la presència de glucagon, tant en els extrets insulínics de la tonyina [Planas i Lluch (33)] com en el bonítol [Lluch i Planas (17), i Planas (30)]. La inactivació de la insulina per efecte de KOH a 37° permet d'apreciar un efecte hiperglucemiant en el conil durant els primers 15 minuts després de la injecció. La incubació dels extrets amb potassa a 100° fa desaparèixer també aquesta activitat.

Ha estat valorat el contingut en glucagon dels extrets insulínics inactivats a 37° C en comparar la seva acció amb l'efecte hiperglucemiant en conills d'unes mostres patró de glucagon Lilly (Indianàpolis).

Hem trobat una riquesa de glucagon que equival a 1,5 i 1,4 mg glucagon/g illots, per a la tonyina i per al bonítol, respectivament. La relació entre ambdues hormones ha estat de 10 µg glucagon/U.I. insulina en la primera espècie citada i 3,5 µg glucagon/U.I. insulina en la segona.

Aquesta valoració quantitativa del contingut en glucagon dels illots de peixos ha estat la primera que hom ha donat. Igualment, han estat poc nombroses les cites sobre aquesta hormona, però cal destacar els treballs de Falkmer (10) en *Cottus scorpius* i com els estudis fisiològics encruats entre diferents vertebrats demostren una notable especificitat

d'espècie. Per a fixar el paper fisiològic d'aquesta hormona en els peixos, no tenim tampoc dades suficients. No obstant això, el fet de la seva especificitat d'espècie ofereix un nou camp d'investigació, relacionant l'estructura molecular i la funció biològica, la qual cosa, a més del seu valor intrínsec, pot donar llum al coneixement del mecanisme d'acció.

3) *El pàncreas endocrí en els escòmbrids.*

Una de les nostres últimes aportacions a l'estudi del pàncreas endocrí en els peixos ha estat el treball dut a terme sobre altre espècies d'escòmbrids (Planas, Carreras i Bosque, 1968). Hom hi analitza des d'un punt de vista anatòmic i histològic el pàncreas endocrí en 5 espècies d'escòmbrids, com és ara: *Scomber scombrus*, L.; *S. colias* Gml.; *Enthynnus alleteratus*, Raf.; *E. pelamys*, L. i *Germo alalunga*, Gml. Amb aquestes dades, juntament amb les obtingudes en aquesta última espècie [Planas (30)] i en la tonyina [Planas i Garcia (35)] podem donar ja una visió completa del grup dels escòmbrids en aquest aspecte.

L'estudi comparat sobre l'anatomia del pàncreas i visceral en general, així com l'estructura i la composició citològica dels illots, en aquestes espècies mostren clarament la distinció de tres tipus (túnids, katsuwònids i escòmbrids) que coincideixen en les tres divisions taxonòmiques que certs autors fan del grup primitiu. És curiós d'assenyalar com aquestes tres subdivisions es presenten també quan hom analitza el rendiment amb insulina [Planas (31)], car els gèneres *Thunnus* i *Germo* són els més rics (150-192 U.I./g illots); els gèneres *Enthynnus* i *Katsuwonus* tenen un rendiment de 130 U.I./g illots, mentre que el gènere *Scombrus* és el menys ric (80-90 U.I./g illots).

4) *Epíleg.*

L'estudi del pàncreas endocrí en els peixos i de les seves substàncies hormonals és, al nostre entendre, una qüestió oberta a noves i variades investigacions.

Les dades que en tenim fins avui, especialment les obtingudes els últims quinze anys [Eppel (9)] ens fan comprendre que aquesta línia d'investigació no ha perdut gens ni mica d'interès, sinó que, al contrari, el manté viu i supera l'efecte de les modes científiques també existents.

Els estudis, inicialment anatòmics i descriptius, han deixat pas a d'altres més bioquímics i fisiològics on han estat descoberts, darrerament, fets inesperats, com és ara les especificitats d'espècie o els espectres d'acció diferents de les insulines de diferents orígens zoològics [Falkmer i Wilson (11)], i la seva presència en els animals invertebrats

[Wilson i Falkmer (42)], que auguren resultats molt interessants, no sols per a la ciència pura com pot ésser l'Endocrinologia Comparada o la Fisiologia Animal, sinó també per a llur aplicació en la Clínica humana.

BIBLIOGRAFIA

1. Audy, G. i Kerly, M. — The content of glycogenolytic factor in pancreas from different species. — *Biochem. J.*, 52, 77-78, 1952.
2. Balcells, R. i Planas Mestres, J. — Estudio biométrico comparado de los nódulos insulínicos del atún y la albacora. — *Inv. Pesq.*, 12, 83-111, 1958.
3. Bowie, J. — Citological studies of the islets of Langerhans in a teleost, *Neomaenis griseus*. — Univ. Toronto, *Studies Physiol. Series*, n.º 87, 1925.
4. Brandes, C. H. — Gewinnung von Insulin aus Fischorganen. — *Artikeldients*, n.º 11. Nov. 1943. — I comunicacions personals.
5. Capparelli, A. — Sur le diabète pancréatique expérimentale. — *Arch. ital. Biol.*, 21, 398, 1894.
6. Diamare, V. — I corpuscoli surrenali di Stannius ed i corpi del cavo abdominale dei Teleostei. — *Boll. Soc. Nat. Napoli*, 9, 10-24, 1895.
7. Diamare, V. — Studii comparativi sulle isole de Langerhans del pancreas. — *Inter. Monat. Anat. Phys.*, 22, 127-187, 1905.
8. Dudley, H. W. — Insulin from cod fish. The direct application of picric acid to the islet tissue. — *Biochem. J.*, 18, 665-670, 1924.
9. Epple, A. — The endocrine pancreas. — En «*Fish Physiology*», Hoar, W. S. i Randall, D. J., Vol. II, pp. 275-319, 1969.
10. Falkmer, S. — Some comparative aspects of pancreatic alpha-cells and glucagon. — *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5, 674-675, 1965.
11. Falkmer, S. i Wilson, S. — Comparative aspects of the immunology and biology of insulin. — *Diabetologia*, 3, 519-528, 1967.
12. Jense, H., Winterstein, O. i Geiling, E. M. K. — Studies on crystalline insulin. VIII. Isolation of crystalline insulin from fish islets (cod and pollock) and from the pig's pancreas. The activity of crystalline insulin and further remarks on its preparation. — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 36, 115-128, 1929.
13. Laguesse, E. — Sur le pancréas du Crénilabre et particulièrement sur le pancréas intra-hépatique. — *Rev. Biol. Nord France*, 7, 343-361, 1895.
14. Legouis, P. — Recherches sur les tubes de Weber et sur les pancréas des poissons osseux. — *Ann. Sci. Zool.*, 17, 1-107, 1873.
15. Lepori, N. G. — Recherche istologica e citologica sur le pancreas di alcuni Teleostei. — *Alti. Soc. Tosc. Sc. Nat. Mem.*, 59, (Serie B), 1-22, 1952.
16. Lepori, N. G. — Il pancreas nei Pesci. — *Arch. ital. Anat. e Embriol.*, 58, 1-58, 1953.
17. Luch, M. i Planas, J. — Presencia de glucagón en los extractos insulínicos del albacora, Germo alalunga, Gml. — *R. esp. Fisiol.*, 12, 21-27, 1956.
18. Macleod, J. J. R. — The source of insulin. A study of the effect produced on blood sugar by extracts of the pancreas and the principle islets of fishes. — *J. Metab. Res.*, 2, 149-172, 1922.
19. Macleod, J. J. R. — The source of insulin. — Univ. Toronto, *Studies, Physiological Series*, n.º 55, 1923.
20. Malandra, B. i Mosca, L. — Il fattore ipergluceumizzante pancreatico nei Teleostei. — *Rass. Fisiopat. Clin. Terap.* 24 43-48, 1952.

21. Marks, H. P. — The biological assay of insulin preparations in comparison with a stable standard. — *Brit. Med. J.*, 2, 102, 1925.
22. McCormick, N. A. — Insulin from fish. — *Bull. Biol. Board Can.*, 7, 3-23, 1924.
23. McCormick, N. A. — The distribution and structure of the islands of Langerhans in certain fresh-water and marine fishes. — *Univ. Toronto, Physiological Series*, n.º 88, 1925.
24. McCormick, N. A. i Noble, E. C. — The yield of insulin from fish. — *Contrib. Can. Biol. Fisheries*, 2, 117-127, 1925.
25. McCormick, N. A. i Noble, E. C. — Insulin from fish. — *J. Biol. Chem.*, 59, 1924.
26. Mialhe, P. — Sur l'existence de l'hormone hyperglycémiant du pancréas. — *Com. Rend. Acad. Sci.*, 235, 94-96, 1952.
27. Nagasawa, K. i Kondo, S. — Extraction of insulin from marine animals. — *J. Pharma. Soc. Japan.*, 62, 237-291, 1942.
28. Nogi, K., Soejima, S. i Kubo, H. — A study of insulin extracted from fish. — *Folia Endocrinol. Japan*, 19, 457-466, 1943.
29. Planas Mestres, J. — Insulina en el atún. — *Thunnus thynnus*, L. — *R. esp. Fisiol.*, 11, 285-295, 1955.
30. Planas Mestres, J. — Estudio sobre el páncreas endocrino del bonito del Norte o albacora, *Germo alalunga*, Gml. — *Inv. Pesqu.*, 9, 119-128, 1957.
31. Planas Mestres, J. — El aprovechamiento de la insulina de pescado. — *Rev. Cien. Apl.*, 13, 193-203, 1959.
32. Planas Mestres, J. — Estudio sobre el contenido insulínico del atún atlántico. — *Inv. Pesq.*, 7, 99-103, 1957.
33. Planas, J. i Lluch, M. — Acción hiperglucemiante de los extractos de nódulos pancreáticos endocrinos en el atún. — *R. esp. Fisiol.*, 12, 295-300, 1956.
34. Planas, J. i Balcells, R. E. — Los escombriformes españoles como fuente de insulina. — *Inv. Pesq.*, 13, 49-64, 1958.
35. Planas, J. i Garcia, F. — New data regarding the pancreatic islets in the tunny fish. — *Acta anat.*, 57, 185-191, 1964.
36. Planas, J., Carreras, J. i Bosque, P. G. — The endocrine pancreas in some Scombridae. — *Acta anat.*, 69, 520-541, 1968.
37. Scott, D. A. — Further studies on crystalline insulin. — *J. Biol. Chem.*, 92, 281-288, 1931.
38. Tateno, S. — Preparation of fish insulin. — *Nôgaku*, 2, 115-121, 1948.
39. Tohyama, Y.; Tetsumoto, S.; Frukuya, S. i Yamada, S. — Studies on insulin from fishes. — *Jap. J. Exp. Med.*, 19, 157-170, 1941.
40. Vallmitjana, L. i Gadea, E. — Estudios histológicos del atún (*Thunnus thynnus*, L.). — *Publ. Inst. Biol. Apl.* 23, 5-29, 1956.
41. Vincent, S.; Dodds, E. C. i Dickens, F. — The pancreas of Teleostean fishes and the source of insulin. — *Lancet*, 2, 115, 1924.
42. Wilson, S. i Falkmer, S. — Starfish insulin. — *Can. J. Biochem.*, 43, 1615-1624, 1965.
43. Yalow, R. S. i Berson, S. A. — Reaction of fish insulins with human insulin antisera. Potencial value in the treatment of insulins resistance. — *New Engl. J. Med.*, 270, 1171-1178, 1964.
44. Zeile, K.; Brandes, C. H.; Hanske, W.; Roever, W. i Ritzhaupt, H. — Über Fischinsulin. — *Pharmazie*, 3, 295-298, 1948.