



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS)

CARRERA: Químico Farmacéutico Biológico

ALUMNO: Roberto Camacho Cruz

MATRICULA: 2122029656

TÍTULO DEL PROYECTO ESPECÍFICO: ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ANOREXIGÉNICA QUE GENERA LA COMBINACIÓN DE MAZINDOL + METFORMINA EN EL CONSUMO DE LECHE AZUCARADA EN RATA

PROYECTO GENÉRICO: Evaluación de productos relacionados con la salud

ETAPA: Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos

LUGAR DE REALIZACIÓN: Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional

PERIODO: Del 26-October-2015 al 26-Abril-2016

ASESORA RESPONSABLE INTERNA: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

ASESOR RESPONSABLE EXTERNO: Dr. Juan Gerardo Reyes García

México, D.F., a 30 de Abril del 2016

ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ANOREXIGÉNICA QUE GENERA LA COMBINACIÓN DE MAZINDOL + METFORMINA EN EL CONSUMO DE LECHE AZUCARADA EN RATA

INTRODUCCIÓN

El incremento en la prevalencia del sobrepeso y la obesidad a nivel mundial es un problema serio de salud ([Lean, 2010](#)). En México, aproximadamente el 70% de la población adulta tiene sobrepeso u obesidad ([Secretaría de Salud, 2010](#)).

En este sentido, se ha observado que la resistencia a la insulina es uno de los principales factores que altera el transporte de ácidos grasos al hígado, incrementando los niveles de triglicéridos, lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) y a la apolipoproteína B (ApoB) ([Cohen et al., 2011](#); [Ndumele et al., 2011](#)), por lo que existe una fuerte correlación entre la grasa corporal y los niveles de insulina o la resistencia a insulina, incluso antes de que los niveles de glucosa se hayan elevado y exista un daño significativo en la función del páncreas ([De Fronzo et al., 2009](#)).

Así, la evidencia nos sugiere que el tratamiento actual del sobrepeso y la obesidad debería ir enfocado en disminuir su morbilidad y mortalidad, al actuar en etapas donde los niveles de resistencia a la insulina se encuentran elevados, pero no existe evidencia de una disminución de la tolerancia a la glucosa, y por ende, no existe un daño significativo en el páncreas. Asimismo, las terapias farmacológicas y no farmacológicas deberían ir enfocadas a

disminuir la resistencia a la insulina y a desarrollar terapias preventivas para la población obesa en riesgo de desarrollar diabetes o enfermedades cardiovasculares de manera eficaz y segura. A este respecto, la metformina parece ser el candidato más fuerte para reducir la resistencia a la insulina en pacientes obesos asintomáticos con alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, ya que entre otras cosas no muestra efecto rebote (Hirst et al., 2012; Diabetes Prevention Program Research Group, 2012). En este sentido, el presente proyecto determinó el tipo de interacción anorexigénica que genera la combinación de metformina con mazindol en ratas, mediante el uso del análisis isobolográfico.

HIPÓTESIS

La combinación metformina + mazindol producirá al menos una interacción anorexigénica de tipo aditiva en la disminución del consumo de leche azucarada en rata.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el tipo de interacción que se presenta con la combinación metformina + mazindol en la disminución del consumo de leche azucarada en rata mediante el uso del análisis isobolográfico.

Objetivos particulares

Determinar la DE₄₀ de metformina y mazindol en el modelo de consumo de leche azucarada en rata mediante curvas dosis-respuesta.

Calcular la DE₄₀ teórica de la combinación metformina + mazindol en el modelo de consumo de leche azucarada en rata.

Determinar la DE₄₀ experimental de la combinación de metformina + mazindol en el modelo de consumo de leche azucarada en rata.

Determinar mediante análisis isoblográfico e índice de interacción el tipo de sinergismo que produce la combinación metformina + mazindol.

Material y métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar de 200 a 250 g de peso corporal. Los animales se mantuvieron con libre acceso a alimento y agua, en un ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Todos los experimentos se condujeron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Cada rata se evaluó una sola vez y se sacrificó en una cámara con dióxido de carbono al final del experimento.

Fármacos

Tanto la metformina (10g) como el mazindol (5g) fueron suspendidos en solución salina isotónica con Tween 80 al 10%. Los fármacos individuales o en combinación fueron preparados el día de la evaluación y fueron administrados de forma oral 30 minutos antes de presentar la leche azucarada a las ratas. La leche azucarada se preparó agregando a 1L de agua hervida, 100 g de leche en polvo y 100 g de sucrosa.

Prueba anorexigénica del consumo de leche azucarada

El presente método fue llevado a cabo con ligeras modificaciones del protocolo previamente descrito por Roth y Rowland (1999) y Rowland y cols. (2000; 2001). Las ratas fueron acostumbradas a consumir un postre de leche azucarada durante 7 días, la cual se presentó diariamente a las 10 de la mañana durante 2 h en mamilas graduadas de plástico. Una vez obtenido un valor de consumo estable, en el día 7 las ratas fueron puestas en ayuno de 12 h y el día del experimento (día 8), las ratas fueron agrupadas en grupos de 6 ratas de tal manera que el consumo basal de leche azucarada fue lo más parecido entre los grupos. En seguida las ratas recibieron de manera oral el vehículo o dosis crecientes de metformina (30, 56, 100, 300, 560, 1000 mg/Kg, p.o.), mazindol (1, 1.7, 3, 10, 30, 56 y 100 mg/Kg, p.o.) o de las combinaciones metformina + mazindol a proporciones equiefectivas de 1:1, 1:3 y 3:1. Treinta minutos después de la administración oral, se les presentó la mamila de leche azucarada y se midió el consumo de ésta en mililitros a los 90 minutos.

Análisis estadístico

Inicialmente, los resultados obtenidos referentes al volumen de leche azucarada consumida en 1.5 horas fueron convertidos a un porcentaje de efecto anorexigénico, considerando al volumen consumido de leche azucarada del grupo vehículo como el 0% de anorexia, mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Efecto anorexigénico} = \frac{\text{Volúmen consumido}_{\text{Vehículo}} - \text{Volúmen consumido}_{\text{Tratamiento}}}{\text{Volúmen consumido}_{\text{Vehículo}}} \times 100$$

Entonces, los datos se expresaron como el promedio \pm el error estándar del porcentaje de leche azucarada consumida en 1.5 horas y se construyeron las curvas dosis respuesta del % de efecto anorexigénico contra las dosis empleadas para calcular la DE₄₀ de los fármacos individuales mediante análisis de regresión lineal. Para determinar la naturaleza de la interacción entre metformina y mazindol se procedió a llevar a cabo el análisis isobolográfico. Para ello, se consideraron dosis equiefectivas de cada fármaco en proporciones 1:1, 1:3 y 3:1. De los resultados experimentales obtenidos de la combinación de metformina y mazindol en las diferentes proporciones se obtuvo una DE₄₀ experimental para cada proporción y para determinar si la combinación produce un efecto de potenciación, aditivo o de antagonismo se calculó la DE₄₀ teórica de acuerdo al método descrito por Tallarida (2000).

Estadísticamente, las curvas dosis respuesta fueron analizadas mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnet. Por su parte, la diferencia estadística entre la DE₄₀ teórica y la DE₄₀ experimental de cada proporción fue evaluada a través de una prueba t de Student. La diferencia estadística de estas pruebas fue considerada significativa cuando se obtuvo una $P < 0.05$. Adicionalmente, el tipo de interacción fue determinado mediante el índice de interacción (γ), gráficamente y mediante la comparación de los intervalos de confianza de la DE₄₀ teórica y la DE₄₀ experimental.

Resultados

Curso temporal en el consumo de leche azucarada

En la **figura 1** se puede observar que el mayor efecto anorexigénico obtenido entre el vehículo y metformina se encuentra a las 2 h, mientras que mazindol muestra su mayor efecto anorexigénico a la media hora y dicho efecto va disminuyendo de manera dependiente del tiempo. En base a los cursos temporales arriba descritos se decidió elegir como punto de evaluación las 2 horas para el análisis isoblográfico, pues como se puede observar en la figura, metformina presenta su efecto anorexigénico máximo y mazindol aún muestra un efecto arriba del 50%.

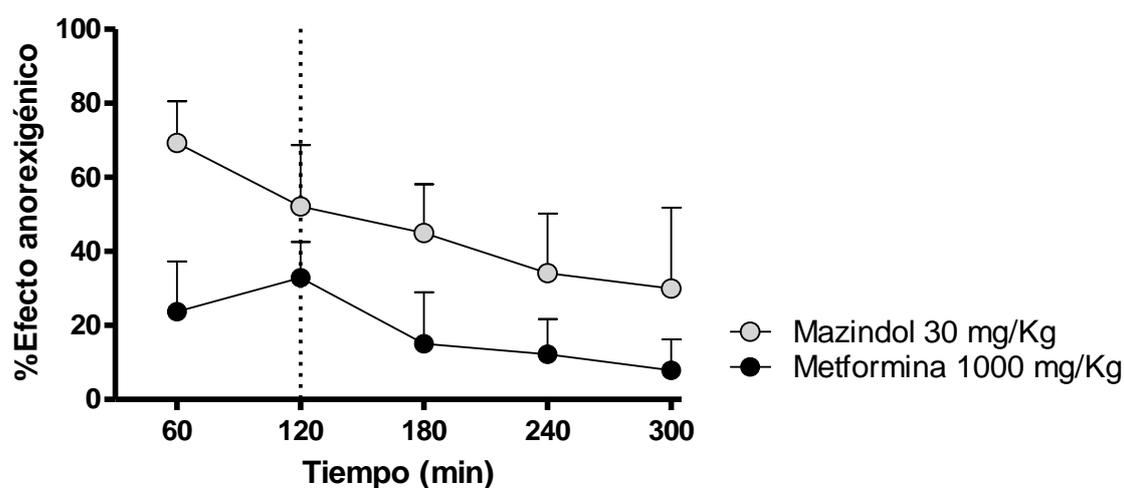


Figura 1. Cursos temporales que muestran el efecto anorexigénico de metformina a una dosis de 1000 mg/Kg o mazindol a 30 mg/Kg en ratas. La leche azucarada se presentó a las ratas 30 minutos después de haber administrado los fármacos por vía oral.

Efecto anorexigénico en ratas privadas de alimento

Una vez establecido el tiempo de evaluación, se construyeron curvas dosis respuesta para mazindol y metformina. En la **figura 2** se muestra que mazindol aumentó el porcentaje de efecto anorexigénico de forma dependiente de la dosis administrada (1, 1.7, 3, 10, 30, 56 y 100 mg/Kg), alcanzando un máximo de efecto a la dosis de 30 mg/Kg. De acuerdo a la curva dosis respuesta obtenida, mazindol presenta una eficacia en este modelo de del $56.4 \pm 2.1\%$ a las dosis de 100 mg/Kg y una dosis efectiva 40 (DE_{40}) de 13.5 ± 3.1 mg/Kg (**Tabla 1**). En la **figura 2** también puede observarse que la parte lineal de la curva de mazindol se encuentra entre 1.7 y 30 mg/Kg y que después de 30 mg/Kg la efectividad de mazindol no incrementa significativamente, pero si sus efectos adversos. A este respecto, las ratas desde los 30 mg/Kg de mazindol mostraron efectos adversos evidentes. A 30 mg/Kg las ratas presentaron piloerección y estereotipia en cabeza, patas delanteras y marcha oscilatoria, en tanto que a las dosis de 56 y 100 mg/Kg se evocaron los síntomas descritos en la dosis anterior de manera más clara, además de piloerección, sangrado nasal y por comisura lagrimal. Asimismo, la dosis de 56 mg/Kg causó la muerte de 1 de 6 ratas dentro de las primeras 24 horas, mientras que las dosis de 100 mg/Kg mato a 4 de los 6 animales de este grupo experimental dentro de las primeras 24 horas de haber administrado el fármaco, por lo que se puede estimar que la DL_{50} de mazindol en rata se encuentra alrededor de los 85 mg/Kg.

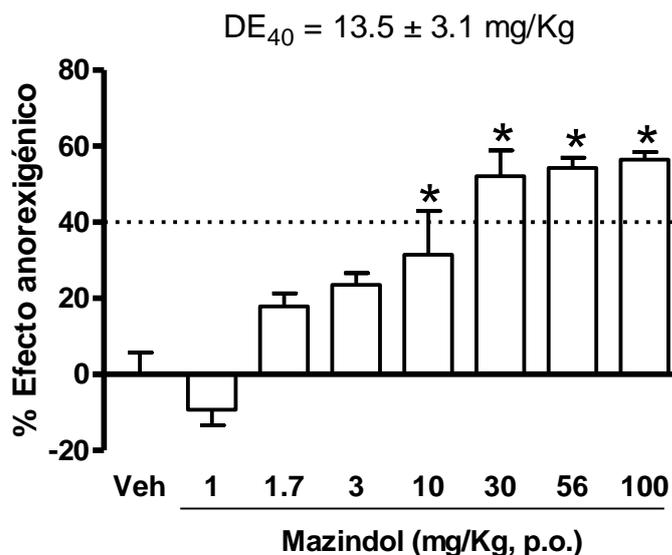


Figura 2. Curva dosis respuesta que muestra el porcentaje de efecto anorexigénico obtenido con la administración oral de dosis crecientes de mazindol en el modelo de consumo de leche azucarada en ratas privadas de alimento. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media de 6 animales por grupo experimental. *Estadísticamente diferente del vehículo (Veh) con una $P < 0.05$ por análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett. La línea punteada nos permite observar las dosis entre las cuales se encuentra la DE_{40} del fármaco.

En cuanto a metformina, en la **figura 3** puede observarse el porcentaje de efecto anorexigénico que generaron dosis crecientes de este fármaco (30, 56, 100, 300, 560 y 1000 mg/Kg). En la gráfica puede apreciarse que a la dosis de 300 mg/Kg metformina presentó una eficacia del $48.6 \pm 7.3\%$ y una $DE_{40} = 208.9 \pm 27.0 \text{ mg/Kg}$ en el rango de dosis de 30 a 300 mg/Kg (**Tabla 1**). Debido a que en la gráfica se observa que dosis mayores a 300 mg/Kg de metformina tienden a disminuir el porcentaje de efectividad anorexigénica del fármaco, se decidió ocupar las dosis de 30, 56, 100 y 300 mg/Kg para llevar a cabo el análisis isobolográfico. En cuanto a sus efectos adversos, metformina fue bien tolerada presentando las ratas solamente letargo e hipocinesia a las dosis de 560 y 1000 mg/Kg (**Tabla 3**).

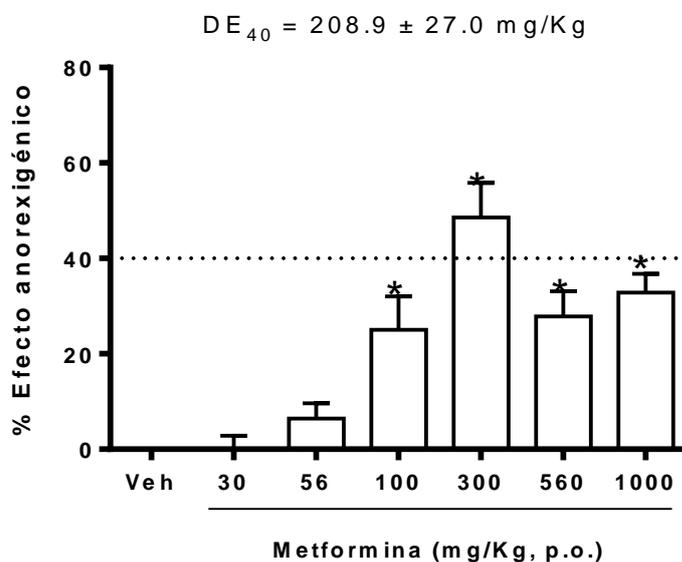


Figura 3. Curva dosis respuesta que muestra el porcentaje de efecto anorexigénico obtenido con la administración oral de dosis crecientes de metformina en el modelo de consumo de leche azucarada en ratas privadas de alimento. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media de 6 animales por grupo experimental. *Estadísticamente diferente del vehículo (Veh) con una $P < 0.05$ por análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett. La línea punteada nos permite observar las dosis entre las cuales se encuentra la DE_{40} del fármaco.

Tabla 1. Dosis efectivas 40 (DE_{40}) obtenidas a partir de la curvas dosis respuesta de mazindol y metformina mediante regresión lineal. Abreviaturas: E.E.M. = error estándar de la media.

Fármaco	DE_{30}	E.E.M. (\pm)	Coefficiente de correlación (R^2)
Mazindol	13.5	3.2	0.943
Metformina	208.9	27.0	0.979

Con base en los datos obtenidos de las curvas dosis respuesta de mazindol y metformina, se procedió al cálculo de las dosis para la construcción de las curvas dosis respuesta de la combinación mazindol + metformina a las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1. En la **figura 4** puede apreciarse que para la proporción 1:1, el efecto anorexigénico que produce la combinación mazindol + metformina en el modelo de consumo de leche azucarada se incrementa de manera dependiente de la dosis. En este modelo de anorexia y con esta proporción (1:1), la combinación produjo una eficacia experimental del $40.0 \pm 3.0\%$ y una DE_{40} experimental de 128.9 ± 25.0 mg/Kg, la cual fue similar a la DE_{40} teórica calculada (111.2 ± 13.6 mg/Kg).

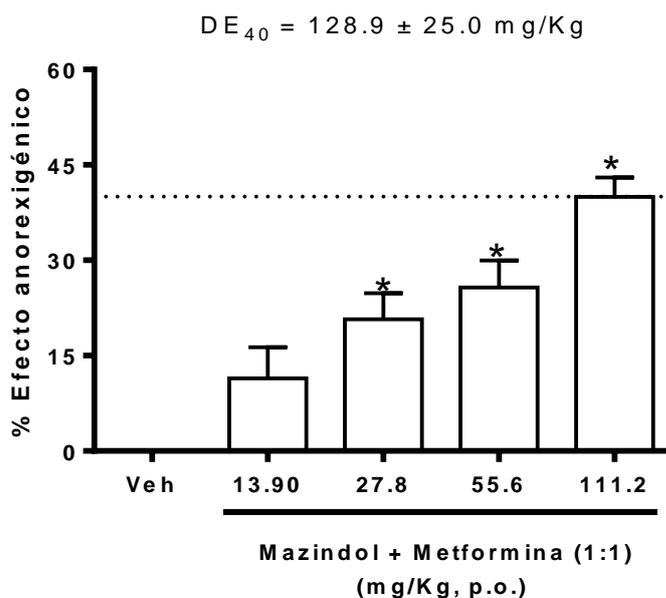


Figura 4. Curva dosis respuesta que muestra el porcentaje de efecto anorexigénico obtenido con la administración oral de dosis crecientes de la combinación de mazindol + metformina ($0.84 + 13.06$, $1.69 + 26.11$, $3.38 + 52.22$ y $6.75 + 104.45$ mg/Kg, respectivamente) a una proporción 1:1 en el modelo de consumo de leche azucarada en ratas privadas de alimento. Por claridad de la imagen, la dosis en el eje Y representa la suma de la dosis de mazindol + metformina en cada combinación. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media de 6 animales por grupo experimental. *Estadísticamente diferente del vehículo con una $P < 0.05$ por análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Vehículo (Veh).

En las **figuras 5 y 6** se muestran las curvas dosis respuesta obtenidas con la combinación de mazindol + metformina para las proporciones 1:3 y 3:1. En ellas puede observarse una eficacia similar a la obtenida en la proporción 1:1, siendo de $34.9 \pm 1.6\%$ y $40.7 \pm 2.3\%$ para las proporciones 1:3 y 3:1 de mazindol + metformina, respectivamente. El resumen de las DE_{40} experimentales obtenidas y teóricas calculadas para cada proporción se muestran en la **tabla 2**.

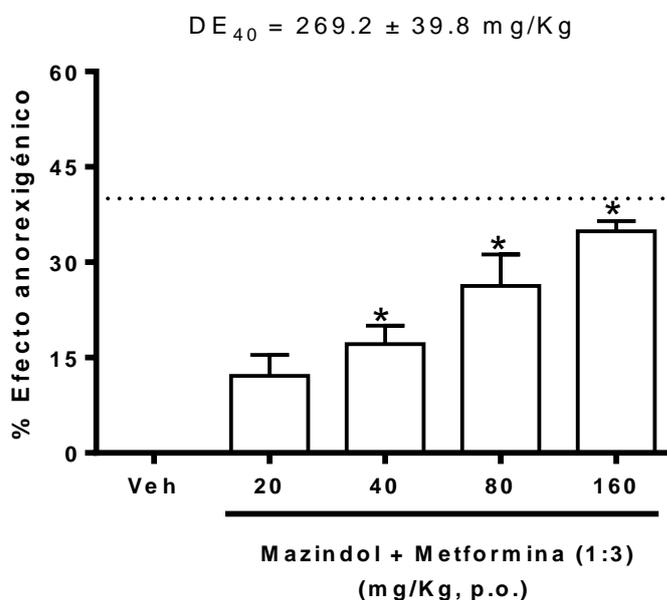


Figura 5. Curva dosis respuesta que muestra el porcentaje de efecto anorexigénico obtenido con la administración oral de dosis crecientes de la combinación mazindol + metformina ($0.42 + 19.58$, $0.84 + 39.16$, $1.67 + 78.33$, $3.34 + 156.66 \text{ mg/Kg}$, respectivamente) a una proporción 1:3 en el modelo de consumo de leche azucarada en ratas privadas de alimento. Por claridad de la imagen, la dosis en el eje Y representa la suma de la dosis de mazindol + metformina en cada combinación. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media de 6 animales por grupo experimental. *Estadísticamente diferente del vehículo con una $P < 0.05$ por análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Vehículo (Veh).

Con respecto a los efectos adversos observados en las combinaciones, sólo las dosis más altas de la combinación de mazindol + metformina a la proporción 3:1 (31.2 y 62.4 mg/Kg), evocaron piloerección, hiperreflexia y estereotipia en las ratas. Contrario a lo observado la proporción anterior, la combinación de mazindol + metformina a las proporciones 1:1 y 1:3 no mostraron efectos adversos aparentes a ninguna de las dosis probadas, sugiriendo que los efectos adversos observados en las combinaciones son debidos principalmente a mazindol.

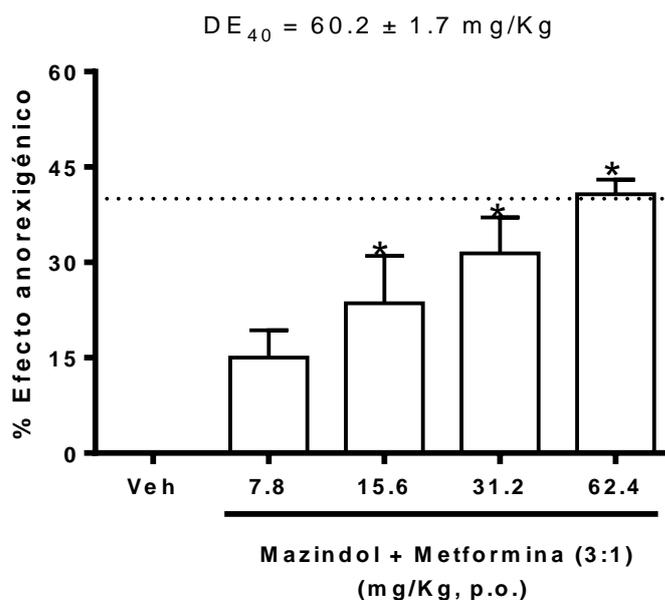


Figura 6. Curva dosis respuesta que muestra el porcentaje de efecto anorexigénico obtenido con la administración oral de dosis crecientes de la combinación mazindol + metformina (1.27 + 6.53, 2.54 + 13.06, 5.08 + 26.12 y 10.16 + 52.24 mg/Kg, respectivamente) a una proporción 3:1 en el modelo de consumo de leche azucarada en ratas privadas de alimento. Por claridad de la imagen, la dosis en el eje Y representa la suma de la dosis de mazindol + metformina en cada combinación. Los datos se expresan como el promedio \pm el error estándar de la media de 6 animales por grupo experimental. *Estadísticamente diferente del vehículo con una $P < 0.05$ por análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Abreviaturas: Vehículo (Veh)

A continuación, se llevó a cabo el análisis gráfico y estadístico de las combinaciones mazindol + metformina a las diferentes proporciones. Dicho análisis sugiere que las combinaciones muestran un efecto aditivo en las tres proporciones, aunque la proporción 1:3 parece tener una tendencia al antagonismo en base a los siguientes criterios:

Los puntos que representan las DE_{40} experimentales en la **figura 7** se encuentran sobre la línea de aditividad en las proporciones 1:1 y 3:1, pero por encima de la línea de aditividad en la proporción 1:3, para las combinaciones de mazindol + metformina evaluadas.

La prueba t de Student no mostró diferencia estadística significativa con una $P \geq 0.05$ entre las DE_{40} experimentales y la DE_{40} teóricas calculadas para todas las proporciones.

El intervalo de confianza de las DE_{40} experimentales se traslapa en todos los casos con los intervalos de confianza calculados para las DE_{40} teóricas (**Tabla 2**).

El índice de interacción (γ) mostró un valor cercano a 1 en las proporciones de mazindol + metformina 1:1 y 3:1, pero dicho valor se encontró por encima de 1 en la proporción de mazindol + metformina 1:3 (**Tabla 2**).

El intervalo de confianza del índice de interacción cruza por 1 en las proporciones de mazindol + metformina 1:1 y 3:1, pero esta por encima de 1 en la proporción de mazindol + metformina 1:3 (**Tabla 2**).

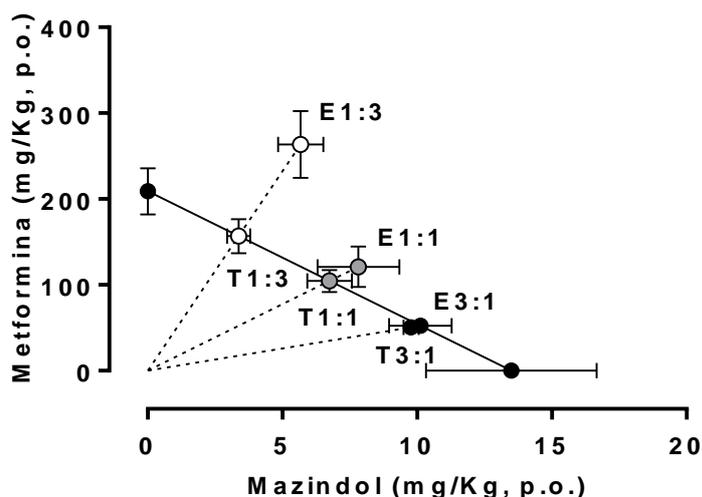


Figura 7. Isoblograma que muestra la interacción de aditividad obtenida con la combinación de mazindol + metformina administrada por vía oral (p.o.) a las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1, en el modelo de anorexia medido por el consumo de leche azucarada en ratas privadas de alimento. Los puntos localizados sobre el eje X y Y representan los valores de DE₄₀ para mazindol y metformina obtenidos experimentalmente. Las barras horizontales y verticales en cada punto representan el error estándar de la media. La línea diagonal que une las DE₄₀ de mazindol y metformina es la línea de aditividad. Los puntos localizados sobre la línea de aditividad, identificados con la letra T 1:1, T1:3 y T3:1, representan la DE₄₀ teóricas de la combinación a las proporciones 1:1, 1:3 y 3:1, respectivamente, mientras que los puntos que se encuentra sobre la línea de aditividad, identificados con la letra E, indican las DE₄₀ obtenidas experimentalmente para las diferentes proporciones. Las DE₄₀ obtenidas experimentalmente no resultaron estadísticamente diferentes de sus respectivas DE₄₀ teóricas mediante la prueba t de Student ($P \geq 0.05$).

Tabla 2. Análisis estadístico de la coadministración de mazindol + metformina. Abreviaturas: E.E.M. = error estándar de la media; DE₄₀ = dosis efectiva 40; I.C. = intervalo de confianza. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre la DE₄₀ experimental y la DE₄₀ teórica mediante la prueba t-Student ($P \geq 0.05$).

Proporción Mazindol + Metformina	DE ₄₀ Teórica ± E.E.M. (I.C.)	DE ₄₀ Experimental ± E.E.M. (I.C.)	Índice de Interacción ± E.E.M. (I.C.)
1 : 1	111.2 ± 13.6 (79.2 – 156.2)	128.9 ± 25.0 (55.8 – 297.3)	1.16 ± 0.27 (0.69 – 1.93)

1 : 3	160.0 ± 20.3 (112.5 – 227.6)	269.2 ± 39.8 (42.6 – 508.5)	1.68 ± 0.33 (1.09 – 2.60)
3 : 1	62.3 ± 7.2 (45.3 – 85.8)	60.2 ± 1.7 (53.3 – 68.0)	0.97 ± 0.11 (0.74 – 1.25)

Conclusiones

El análisis isoblográfico de la combinación de mazindol + metformina sugiere que entre estos dos fármacos existe una interacción aditiva a las proporciones 1:1 y 3:1, pero una tendencia a la subaditividad en la proporción 1:3, lo que en otras palabras quiere decir, que el efecto de cada fármaco en la combinación se suma para alcanzar el efecto anorexigénico esperado teóricamente. Asimismo, parece ser que mazindol contribuye más al efecto anorexigénico observado, pues como ya se mencionó, cuando la cantidad de mazindol disminuye y la de metformina se aumenta (proporción 1:3), la combinación parece moverse hacia la subaditividad.

Por otro lado, las proporciones 1:1 y 1:3 de mazindol y metformina no presentaron eventos adversos evidentes en ninguna de las dosis evaluadas, no así la combinación de mazindol + metformina a la proporción 3:1, la cual presentó efectos adversos similares a los observados con mazindol de manera individual, sugiriendo que en la combinación, mazindol contribuye de manera más importante a la presencia de estos efectos adversos, sobretudo, cuando contribuye de manera predominante en la eficacia de la combinación, por lo que para el desarrollo de una formulación sería conveniente utilizar dosis clínicas moderadas de ambos fármacos (1 ó 2 mg de mazindol + 500 ó 1000 mg de metformina al día), con la finalidad de disminuir los efectos adversos de

la combinación sin sacrificar el efecto anorexigénico de los fármacos individuales.

Dado que el modelo de consumo de leche azucarada es un modelo de anorexia animal predictivo de los efectos que se presentaran en el ser humano, los datos sugieren que la combinación mazindol + metformina pudiera ser útil para el tratamiento de la obesidad en el humano, ya que disminuye los efectos adversos inducidos por los fármacos administrados de manera individual sin sacrificar su eficacia anorexigénica.

Referencias

Aubert G, Mansuy V, Voirol MJ, Pellerin L, Pralong FP. The anorexigenic effects of metformin involve increases in hypothalamic leptin receptor expression. *Metabolism*. 2011;60(3):327-334.

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332(6037):1519-1523.

DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773-795.

Diabetes Prevention Program Research Group. Long-term safety, tolerability, and weight loss associated with metformin in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetes Care*. 2012;35(4):731-737.

Gogerty JH, Trafold JH. Chemistry and pharmacology of mazindol. *Triangle*. 1976;15(1):25-36.

Hirst JA, Farmer AJ, Ali R, Roberts NW, Stevens RJ. Quantifying the effect of metformin treatment and dose on glycemic control. *Diabetes Care*. 2012;35(2):446-454.

Inoue S, Egawa M, Satoh S, Saito M, Suzuki H, Kumahara Y, Abe M, Kumagai A, Goto Y, Shizume K, Shimizu N, Naito C, Onishi T. Clinical and basic aspects of an anorexiant, mazindol, as an antiobesity agent in Japan. *Am J Clin Nutr*. 1992;55(1 Suppl):199S-202S.

Lean M. Health consequences of overweight and obesity in adults. In: Jeffery RW, Ball K, Brug J, editors. *Obesity epidemiology from aetiology to public health*. 2nd ed. Ed. Oxford University Press, New York, USA, 2010. p. 43–58.

Lindsay JR, Duffy NA, McKillop AM, Ardill J, O'Harte FP, Flatt PR, Bell PM. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2005 May;22(5):654-657.

Malin SK, Kashyap SR. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(5):323-329.

Mulherin AJ, Oh AH, Kim H, Grieco A, Lauffer LM, Brubaker PL. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology*. 2011;152(12):4610-4619.

Ndumele CE, Nasir K, Conceição RD, Carvalho JA, Blumenthal RS, Santos RD. Hepatic steatosis, obesity, and the metabolic syndrome are independently and additively associated with increased systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1927-1932.

Roth JD, Rowland NE. Anorectic efficacy of the fenfluramine/phentermine combination in rats: additivity or synergy? *Eur J Pharmacol*. 1999 Jun 4;373(2-3):127-34.

Rowland NE, Marshall M, Roth JD. Comparison of either norepinephrine-uptake inhibitors or phentermine combined with serotonergic agents on food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2000 Mar;149(1):77-83.

Rowland NE, Lo J, Robertson K. Acute anorectic effect of single and combined drugs in mice using a non-deprivation protocol. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Sep;157(2):193-6.

Secretaría de Salud. Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria. Secretaría de Salud. Distrito Federal, México, 2010.

Shiraishi T. Mazindol effects on the salivary and gastric acid secretory mechanisms. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1984 Feb;83(2):159-72.

Slama G, Selmi A, Hautecouverture M, Tchobroutsky G. Double blind clinical trial of mazindol on weight loss blood glucose, plasma insulin and serum lipids in overweight diabetic patients. *Diabete Metab*. 1978; 4(3):193-199.

Tallarida RJ. *Drug Synergism and Dose-Effect Data Analysis*. Chapman & Hall/CRC, New York. 2000; pp 1–72.

Usami M, Seino Y, Nishi S, Nakahara H, Ikeda M, Matsukura S, Imura H. Effect of mazindol on insulin and glucagon secretion in ventromedial hypothalamic obese rats. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1985; 85(4):297-303.