

Susceptibilidad de generar drepanocitos en muestras de pacientes heterocigotos para hemoglobina S (rasgo falciforme) que padecen diabetes *mellitus* tipo 2

Pablo Díaz-Piedra¹, Alberto Rafael Cervantes-Villagrana², Raúl Ramos-Jiménez¹, José Miguel Presno-Bernal³ y Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana^{4*}

¹Departamento de Hematología, Laboratorio Carpermor, México, D.F., México; ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México; ³Dirección Proyectos e Investigación, Grupo Diagnóstico Médico Proa, México, D.F., México; ⁴Departamento de Investigación Clínica, Grupo Diagnóstico Médico Proa, México, D.F., México

Resumen

La hemoglobina S (HbS) es una proteína anormal que produce cambios morfológicos en los eritrocitos en condiciones de bajo oxígeno. En México se reporta hasta un 13.7% de la población con la mutación en un alelo considerada asintomática (rasgo falciforme). El rasgo falciforme y diabetes mellitus (DM) se presentan juntas en más de 1 millón de pacientes a nivel mundial. Este binomio posiblemente potencia las alteraciones microvasculares en retinopatía y síndrome torácico agudo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inducción de drepanocitos en muestras de pacientes diabéticos con rasgo falciforme para identificar parámetros alterados de la serie roja. Para ello, obtuvimos muestras de pacientes diabéticos para determinar hemoglobina glucosilada A1c (HbA1c) y HbS, además de biometría para analizar los datos eritrocitarios. Encontramos que los pacientes diabéticos masculinos con mayor edad fueron susceptibles a generar drepanocitos y correlaciona con un menor conteo de eritrocitos (RBC) y un incremento del volumen corpuscular medio (MCV). En muestras de pacientes diabéticas femeninas no se presentaron diferencias. Nosotros concluimos que las muestras de pacientes con rasgo falciforme y diabetes pueden generar drepanocitos en frotis; y en varones corresponden a individuos con mayor edad, un menor RBC y un mayor MCV como parámetros de susceptibilidad.

PALABRAS CLAVE: Hemoglobina S. Drepanocitos. Diabetes mellitus. Rasgo falciforme.

Abstract

Hemoglobin S is an abnormal protein that induces morphological changes in erythrocyte in low-oxygen conditions. In Mexico, it is reported that up to 13.7% of the population with mutation in one allele are considered asymptomatic (sickle cell trait). The sickle cell trait and diabetes mellitus are conditions that occur together in more than one million patients worldwide. Both diseases possibly produce microvascular changes in retinopathy and acute chest syndrome. The aim of this study was to evaluate the induction of sickle cells in samples of diabetic patients with sickle cell trait to identify altered red cell parameters. We obtained samples of diabetic patients to determine hemoglobin A1c and S; furthermore, red blood cell biometrics data were analyzed. We found that older men with diabetes were susceptible to generate sickle cells and this correlated with reduced red blood cell count and an increase in media cell volume. In samples of women diabetes, there were no differences.

Correspondencia:

*Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana
Alfonso Herrera, 75
Col. San Rafael, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06470, México, D.F.,
México
E-mail: rdancervantes@hotmail.com

Fecha de recepción: 28-09-2014
Fecha de aceptación: 22-01-2015

We conclude that samples from patients with sickle cell trait and diabetes can cause sickle cells with high frequency in men, with lower red blood cells count and increased mean corpuscular volume as susceptibility parameters. (Gac Med Mex. 2015;151:757-63)

Corresponding author: Rodolfo Daniel Cervantes-Villagrana, rdancervantes@hotmail.com

KEY WORDS: Hemoglobin S. Sickle cell. Diabetes mellitus. Sickle cell trait.

Introducción

La hemoglobina (Hb) es una proteína presente en los eritrocitos cuya función es unir oxígeno para transportarlo a todos los tejidos del organismo¹. Se han descrito cerca de 400 variantes de Hb que difieren en uno o más aminoácidos². Una variante de la Hb es conocida como HbS, la cual induce cambios en la función de la unión con el oxígeno, lo que lleva a una anemia hemolítica crónica cuando la mutación se encuentra en los dos alelos; además, se ha encontrado que hasta un 20% de la población africana produce este tipo de hemoglobinopatía^{3,4}. En México se presenta una variabilidad del 0.6 y hasta 13.7% en 5 poblaciones estudiadas a lo largo del país; esta diferencia se considera que es causada por mestizaje de los mexicanos con población africana⁵. Se ha reportado que los pacientes que son portadores parciales de HbS generalmente son asintomáticos debido a que sólo del 35 al 45% corresponde a esta HbS, mientras que el resto lo ocupan Hb normales⁶.

La alteración molecular en la HbS consiste en una mutación en la cadena β de una timina por alanina que se traduce como un cambio de ácido glutámico por una valina⁷. Esta mutación genera una modificación fisioanatómica de los eritrocitos conocida como drepanocitosis, la cual ocurre en pacientes que presentan la variante génica en ambos alelos, generando una subunidad β de la Hb capaz de polimerizarse en condiciones de bajo oxígeno en estructuras filamentosas bien definidas, hasta llevar a la degeneración del eritrocito, modificando su forma bicóncava a una forma de hoz conocida como drepanocito^{8,9}. La formación de drepanocitos induce la alta adherencia entre las células alteradas¹⁰, además de la activación de cascadas de coagulación¹¹ y respuesta del sistema inmunológico¹², estos procesos producen el bloqueo parcial o total de los vasos sanguíneos de bajo calibre que irrigan los órganos vitales, situación que puede culminar en una isquemia aguda u otra complicación hemodinámica que puede llevar a la muerte del paciente¹³. Los individuos que presentan la mutación en un solo alelo (heterocigoto) son considerados asintomáticos y denominados como pacientes con rasgo falciforme que no requieren

tratamiento, sin embargo investigaciones exhaustivas proponen la susceptibilidad a efectos letales en condiciones de hipoxia severa aguda, como es el caso de la muerte súbita en deportistas; comúnmente la muerte de estos individuos es bajo situaciones repentinas durante la actividad física excesiva¹⁴.

La DM es un grave y creciente problema de salud en todo el mundo y se asocia con graves complicaciones agudas y crónicas que influyen negativamente tanto en la calidad de vida como la supervivencia de los individuos afectados¹⁵. Además, es caracterizada por una alteración metabólica¹⁶ e hiperglucemia¹⁷ que involucra la generación de estrés oxidativo¹⁸ y un fenómeno de inflamación generalizada¹⁹. También se ha relacionado con trastornos cardiovasculares que involucran disfunción endotelial²⁰, alteración en las cascadas de coagulación²¹ y episodios de hipoxia tisular²². Las células con rasgo falciforme y la DM son condiciones que comúnmente se presentan juntas en más de 1 millón de pacientes a nivel mundial²³. Este binomio quizá provoca alteraciones microvasculares, favoreciendo la generación de drepanocitos en reportes de casos clínicos sobre retinopatía y síndrome torácico agudo en los pacientes diabéticos²⁴. Sin embargo, los reportes son insuficientes para entender los eventos patológicos que pueden ocasionar el binomio DM y rasgo falciforme debido a HbS y Hb C. Es por ello que es de importancia estudiar la susceptibilidad de los eritrocitos en degenerar a drepanocitos en un grupo de pacientes en población mexicana con DM y con rasgo falciforme (heterocigotos de HbS) para un mejor entendimiento del binomio. El presente estudio tiene la finalidad de estudiar la susceptibilidad de los eritrocitos a degenerar a drepanocitos en pacientes con DM tipo 2.

Metodología

Selección de pacientes y determinación de HbA1c y HbS

Se seleccionaron los pacientes de población mexicana y que padecen DM tipo 2 ya diagnosticados, a los cuales se les realizó una toma de muestra sanguínea con vacutainer en tubos con EDTA como anti-coagulante,

posteriormente se les determinó la HbA1c y presentaron además un porcentaje HbS, correspondiente a una mutación en un solo alelo (heterocigotos de HbS o rasgo falciforme). La determinación de los valores de HbA1c y HbS fue realizada mediante HPLC (instrumento Variant II turbo de BioRad) y por electroforesis (Spife-Helena), respectivamente.

Los datos clínicos fueron obtenidos en el Laboratorio Carpermor, S.A. de C.V. De acuerdo con la Ley General de Salud, el estudio no representa un riesgo físico ni de confidencialidad, por lo tanto, no requirió la firma de consentimiento de los pacientes. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Laboratorio Carpermor.

Biometría hemática

Todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo con citoquímica en el instrumento ADVIA® 120 (Hematology System, SIEMENS) para obtener los valores del hemograma de la serie roja que corresponden a los siguientes parámetros: RBC, Hb, hematocrito (HCT), MCV, hemoglobina corpuscular media (HCM), y concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM).

Prueba de inducción de drepanocitos

Se realizó la prueba de inducción de drepanocitos con metabisulfito de sodio al 2% (J.T. Baker); para ello, se tomó una gota de sangre sobre un portaobjetos de las muestras seleccionadas durante el procesamiento de la HbA1c en el instrumento Variant que arrojaron adicionalmente un porcentaje de HbS, posteriormente se añadió una gota de solución reductora de metabisulfito de sodio al 2% y se colocó el cubreobjetos, finalmente se sellaron los bordes con cera para observar al microscopio con monitoreo en 1, 2 y 24 horas.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la prueba t cuando la distribución de los datos fue paramétrica y la prueba Mann-Whitney cuando la distribución fue no paramétrica. El análisis estadístico se realizó en el software SigmaPlot 11.0, mientras que en el software GraphPad Prism 5.0 se realizaron los gráficos.

Resultados

Fueron seleccionadas y evaluadas 150 muestras sanguíneas de pacientes diabéticos positivos para HbS

que corresponden a individuos heterocigotos con la mutación en uno de sus alelos; de los cuales 74 muestras corresponden a mujeres y 76 muestras de varones. Inicialmente, realizamos un estudio comparativo con la finalidad de evaluar las variabilidades de la determinación de HbS por la técnica de HPLC y por la técnica de electroforesis en las mismas muestras de los pacientes diabéticos. Nosotros encontramos que con el uso de la técnica electroforesis se obtuvieron valores más elevados de HbS en ambos géneros (Fig. 1 A).

En los individuos que identificamos HbS correspondiente al rasgo falciforme, realizamos la prueba de inducción de drepanocitos con metabisulfito en las muestras de pacientes diabéticos. En estas muestras analizadas, a pesar de la presencia de HbS, algunas de ellas no degeneraron a células falciformes, pero encontramos diferencias en algunos parámetros como la edad, RBC y MCV entre la población que fue positiva y negativa a la inducción de drepanocitos, como se describe más adelante.

El contenido de HbS en muestras de varones mostraron diferencias significativas con una $p = 0.04$ entre aquellos que tuvieron inducción negativa o positiva de células falciformes, es decir, la cantidad de HbS fue superior en aquellas muestras que tuvieron una inducción de drepanocitos positiva, lo cual es consistente a la susceptibilidad en la degeneración de los hematíes. En contraste, observamos que en las muestras de mujeres con inducción positiva y negativa no hubo diferencias en el contenido de HbS, lo cual sugiere que existen factores adicionales que contribuyen en la degeneración a células falciformes en esta población (Fig. 1 B).

En base a las dos poblaciones que definimos como positivas o negativas para la prueba de inducción de drepanocitos y que comparten el diagnóstico de diabetes y el rasgo falciforme, nosotros analizamos la relación entre la HbA1c y la HbS en pacientes diabéticos, sin embargo, los resultados mostraron que no existen diferencias significativas (Fig. 1 C).

Posteriormente analizamos otros datos clínicos asociados a las muestras sometidas a inducción de drepanocitos y encontramos que los individuos con prueba positiva de inducción de drepanocitos (sin distinción del género) tienen edad más avanzada que aquellos que no generaron drepanocitos durante la prueba de metabisulfito (Fig. 2 A). Además, determinamos que las muestras de sangre sensibles a la inducción de drepanocitos corresponden a los pacientes con un menor RBC y un mayor MCV, lo cual nos sugiere que las muestras que son sensibles a inducción de drepanocitos contienen generalmente

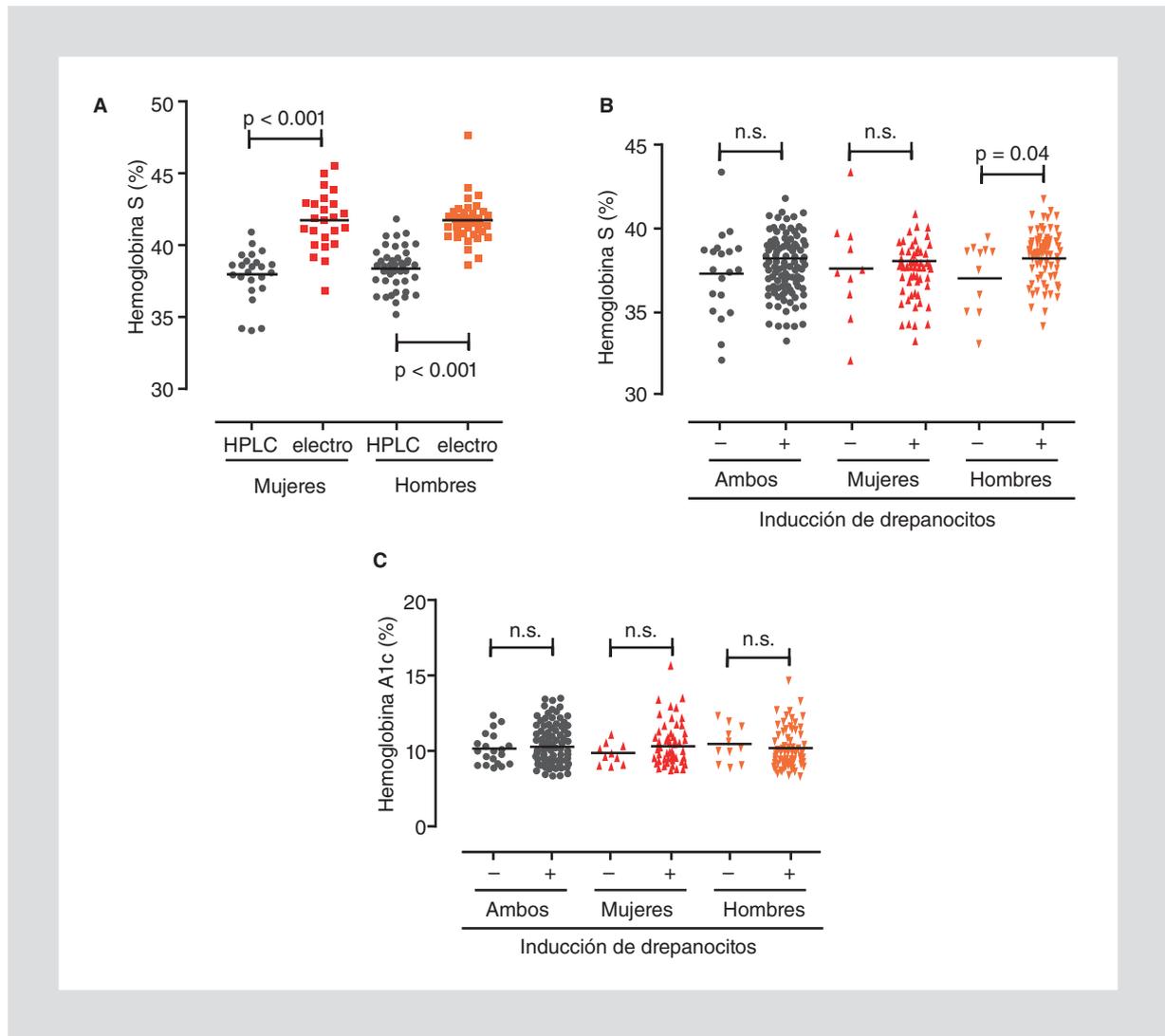


Figura 1. Cuantificación de hemoglobina S e inducción de drepanocitos en pacientes diabéticos no se asocia con variaciones de la hemoglobina glucosilada. **A:** comparación de la cantidad de hemoglobina S determinada por HPLC y electroforesis. Prueba t y Mann-Whitney. **B:** cantidad de hemoglobina S en los eritrocitos positivos y negativos a la prueba de inducción de drepanocitos. Prueba Mann-Whitney. **C:** cantidad de hemoglobina A1c en los eritrocitos positivos y negativos en la prueba de inducción de drepanocitos. Prueba Mann-Whitney. n.s.: no significativo.

hematíes grandes o macrocíticos (Fig. 2 B y C). El resto de los parámetros correspondientes a la serie roja no arrojaron diferencias significativas entre las muestras positivas y negativas de la prueba de inducción de drepanocitos.

Al estratificar los datos en base al género de los individuos, encontramos que en las mujeres no hay diferencias significativas en la inducción de drepanocitos con respecto a la edad con una $p = 0.9118$. Esto nos sugiere que en esta población la edad no es un factor de susceptibilidad para favorecer la inducción de drepanocitos. En contraste, los hombres mostraron una clara diferencia de edad entre los que generaron y no generaron drepanocitos con una $p = 0.0023$, lo

cual sugiere que esta población es susceptible a generar drepanocitos conforme avanza la edad de los individuos (Fig. 3 A).

En conjunto, los parámetros clínicos del RBC y el MCV mostraron diferencias significativas en los varones, con incremento en el RBC ($p = 0.0149$) y valores superiores de MCV ($p = 0.0004$) en las muestras con inducción de drepanocitos positiva con respecto a las muestras con inducción negativa. Por su parte, en las muestras correspondientes a las mujeres no se observó diferencia entre las muestras positivas y negativas en el RBC ($p = 0.0985$) y tampoco en el MCV ($p = 0.304$), por lo tanto, sólo en los varones se presenta una correlación clínica entre la susceptibilidad de los

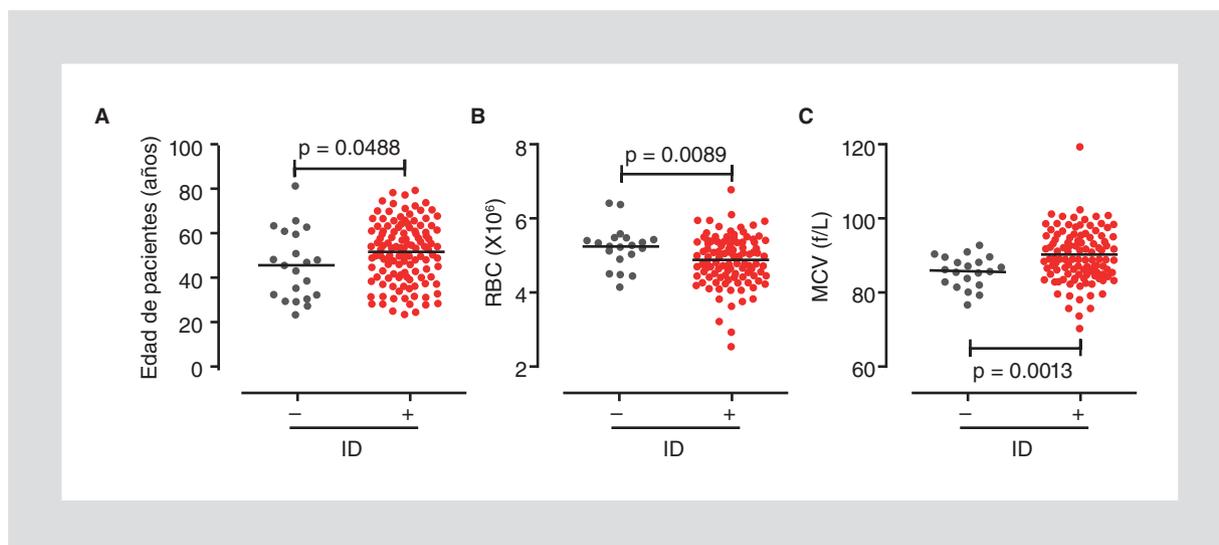


Figura 2. Los pacientes diabéticos con rasgo falciforme y que son positivos a la prueba de inducción de drepanocitos tienen reducción de la cuenta eritrocitaria (RBC) e incremento del volumen corpuscular medio (MCV) en función de la edad. **A:** edad de los pacientes diabéticos con inducción de drepanocitos positiva vs. negativa. Prueba t. **B:** disminución en la cuenta de eritrocitos de pacientes diabéticos positivos a la inducción de drepanocitos. Prueba Mann Whitney. **C:** incremento del volumen corpuscular medio en los pacientes diabéticos positivos a la inducción de drepanocitos. Prueba Mann Whitney.

eritrocitos en la prueba de inducción de drepanocitos y la disminución del RBC, el incremento del MCV y la edad más avanzada de los individuos.

Discusión

Nuestro grupo de investigación estudió la generación de drepanocitos en pacientes heterocigotos para HbS y que además padecían DM tipo 2. La DM ocasiona problemas cardiovasculares y hemodinámicos que agravan la salud de los pacientes²⁵, es por ello que estudiamos en esta población el rasgo falciforme mediante la inducción de drepanocitos de muestras sanguíneas.

Inicialmente comparamos los métodos analíticos para analizar el porcentaje de HbS y encontramos diferencias significativas entre las dos técnicas, esto puede ser debido a que la técnica de HPLC es más sensible que la electroforesis. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Keren, et al. donde se muestra la alta sensibilidad de HPLC²⁶.

Nuestros resultados mostraron que conforme avanza la edad del individuo, particularmente en varones, los eritrocitos que contienen HbS son más susceptibles a deformarse a drepanocitos. Este fenómeno coincide en estudios previos en pacientes diabéticos donde los eventos patológicos cardiovasculares y hematológicos evolucionan dependiendo de la edad²⁵. Es importante señalar que en nuestro estudio la incidencia en el porcentaje

de HbS en pacientes diabéticos es mayor en hombres con inducción positiva de eritrocitos versus las negativas, y no ocurre en las muestras de mujeres; esto puede explicarse por la cantidad basal de Hb y células rojas presentes en el hombre para cubrir las necesidades de oxigenación tisular²⁷. Sin embargo, estudios realizados por Garrote y Santana en el 2013 reportaron que atletas femeninas que presentan HbS incrementan la posibilidad de generar drepanocitos, debido a la disminución de la absorción del hierro por incremento del peristaltismo, hemólisis mecánica del hematíe y pérdidas por el sangrado menstrual de la mujer en edad fértil; estos datos se han señalado como las principales causas²⁸. Por otro lado, la formación de drepanocitos no mostró diferencias significativas en función de la concentración de HbA1c, los resultados coinciden con el estudio realizado por Ama, et al. en el 2012²⁹. Esto indica que el rasgo en forma de hoz característico de este padecimiento no depende del incremento o disminución de la HbA1c, es decir, la formación de células falciformes no se ve favorecida o impedida por la glucosilación no enzimática de la Hb. Estos datos concuerdan con reportes anteriormente publicados^{24,30}. En este sentido, se sabe que la HbS es susceptible a ser glucosilada³¹⁻³⁴ y desconocemos el porcentaje de HbS que se encontraba glucosilada en las muestras analizadas y cómo podría afectar esta modificación postraduccional no enzimática en el contexto de la cinética de polimerización de la HbS,

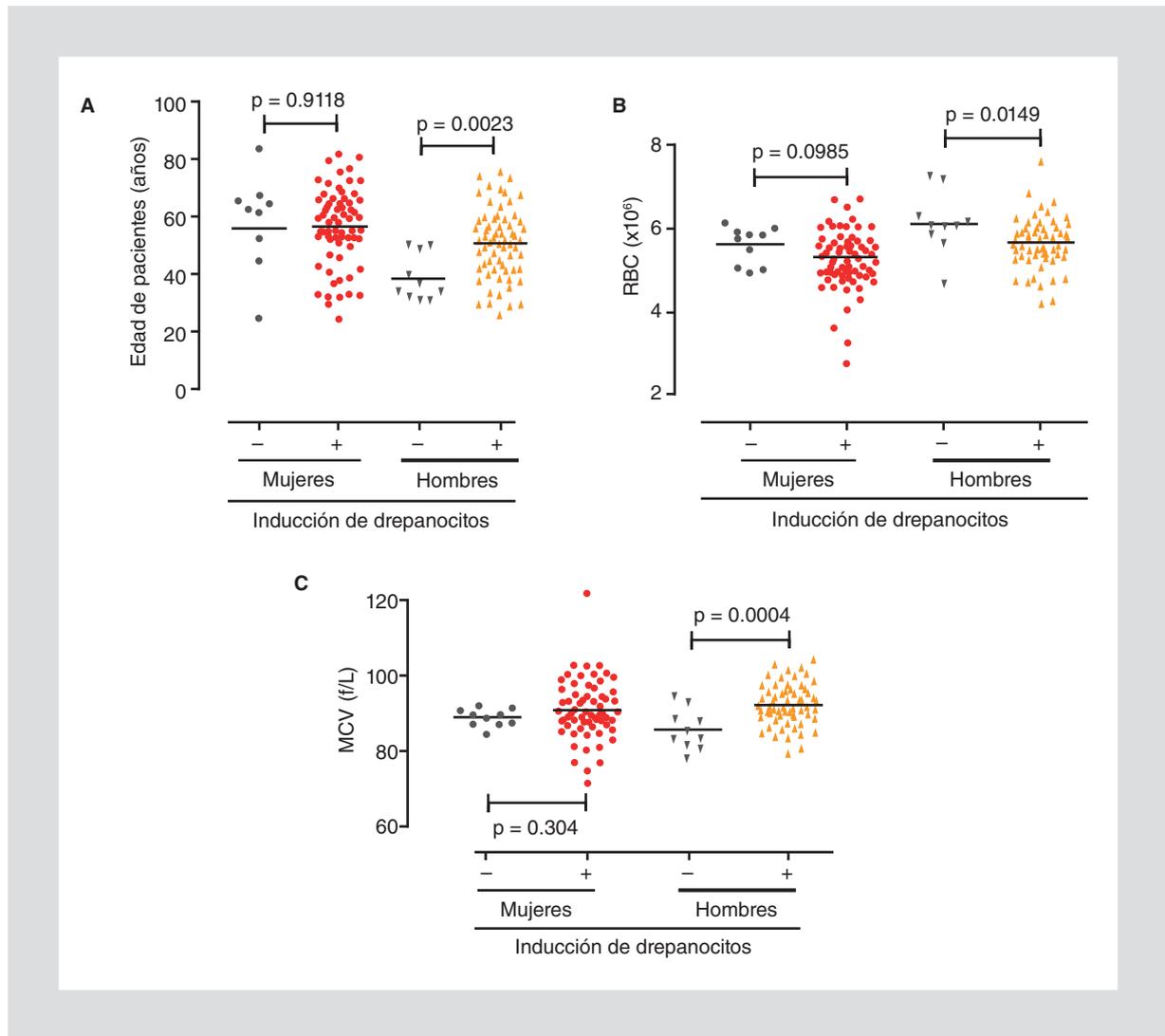


Figura 3. Los pacientes masculinos diabéticos con rasgo falciforme que presentan susceptibilidad a la inducción de drepanocitos, pero no las mujeres, tienen reducción de la cuenta eritrocitaria (RBC) e incremento del volumen corpuscular medio (MCV) en función de la edad. **A:** los pacientes masculinos de mayor edad presentaron inducción de drepanocitos. Prueba t. **B:** los pacientes masculinos con menor conteo de eritrocitos en sangre total, presentaron inducción de drepanocitos. Prueba Mann Whitney **C:** Los pacientes masculinos con eritrocitos de mayor volumen corpuscular medio, presentan inducción de drepanocitos. Prueba Mann Whitney.

situación que requiere ser aclarada en estudios futuros dentro de la población evaluada.

Los individuos heterocigotos a HbS que padecen DM mostraron un RBC inferior que coincide con los rasgos característicos de estas hemoglobinopatías³⁵; es posible que la presencia parcial de HbS induzca la destrucción de hematíes de una manera discreta en el transcurso de vida del individuo. También se encontró que el MCV se encuentra elevado en muestras de pacientes que generan drepanocitos, esto se debe al incremento de la síntesis de hemoglobina con la finalidad de cubrir las necesidades de oxigenación del organismo³⁶. Particularmente, las muestras corres-

pondientes a los hombres fueron las que mostraron diferencias en los parámetros mencionados, es decir, este género parece ser más sensible a la presencia de HbS según nuestros resultados. Reportes indican que el rasgo falciforme en pacientes diabéticos afecta fundamentalmente al género masculino, incrementando la frecuencia de alteraciones microvasculares³⁷ y acelerando alteraciones cardiovasculares y cerebrovasculares, así como la mortalidad en africanos con diabetes tipo 2³⁸.

Los reportes sobre el binomio DM y rasgo falciforme por HbS y Hb C son insuficientes para aclarar las consecuencias que pueden producir la co-existencia de los

padecimientos y bajo qué condiciones pueden ser favorecidas las complicaciones en los individuos. Es por ello que es necesario establecer estudios prospectivos que pretendan indagar en las consecuencias del binomio y los mecanismos moleculares involucrados. Además, es necesario incrementar la población de estudio incluyendo pacientes heterocigotos para HbS no diabéticos y pacientes únicamente diabéticos con la finalidad de contrastar, entender y evaluar las consecuencias cardiovasculares y hemodinámicas que presenta este binomio en la población mexicana. Finalmente, el diseño de modelos animales que permitan simular el rasgo falciforme junto con la DM permitirá evaluar en profundidad las consecuencias de este binomio desde el punto de vista molecular y fisiopatológico para establecer estrategias terapéuticas de ser necesario.

Conclusiones

Nosotros concluimos que las muestras de pacientes con rasgo falciforme y diabetes pueden generar drepanocitos en frotis bajo el protocolo de inducción por metabisulfito con más del 80% de frecuencia. Las muestras de pacientes masculinos con inducción positiva corresponden a individuos con mayor edad, un menor RBC y un mayor MCV como parámetros de susceptibilidad. Las muestras obtenidas de mujeres no presentaron diferencias significativas en los parámetros de la serie roja.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Grupo Diagnóstico Médico Proa, a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav).

Bibliografía

- Snell FM. Facilitated transport of oxygen through solutions of hemoglobin. *J Theor Biol.* 1965;8:469-79.
- Macchiato MF, Tramontano A. VARIANT: a store and retrieval system for human haemoglobin variants. *Comput Methods Programs Biomed.* 1990;31:113-4.
- Zeng Y, Huang S. The studies of hemoglobinopathies and thalassemia in China--the experiences in Shanghai Institute of Medical Genetics. *Clin Chim Acta.* 2001;313:107-11.
- Lorey FW, Arnopp J, Cunningham GC. Distribution of hemoglobinopathy variants by ethnicity in a multiethnic state. *Genet Epidemiol.* 1996;13:501-12.
- Penalosa-Espinosa RI, Buentello-Malo L, Hernandez-Maya MA, et al. Hemoglobin S frequency in five Mexican populations and its importance in public health. *Salud Publica Mex.* 2008;50:325-9.
- R HG. Hemoglobin Disorders. En: Nelson textbook of pediatrics; Elsevier; 2000, pp.
- Wajcman H, Prehu C, Bardakdjian-Michau J, et al. Abnormal hemoglobins: laboratory methods. *Hemoglobin.* 2001;25:169-81.
- Dong C, Chadwick RS, Schechter AN. Influence of sickle hemoglobin polymerization and membrane properties on deformability of sickle erythrocytes in the microcirculation. *Biophys J.* 1992;63:774-83.
- Rodgers GP, Schechter AN, Noguchi CT, et al. Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. *N Engl J Med.* 1984;311:1534-8.
- Chien S, Kaperonis AA, King RG, et al. Rheology of sickle cells and its role in microcirculatory dynamics. *Prog Clin Biol Res.* 1987;240:151-65.
- Connes P, Tripette J, Chalabi T, et al. Effects of strenuous exercise on blood coagulation activity in sickle cell trait carriers. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;38:13-21.
- Abu-Zeid YA, Theander TG, Abdulhadi NH, et al. Modulation of the cellular immune response during Plasmodium falciparum infections in sickle cell trait individuals. *Clin Exp Immunol.* 1992;88:112-8.
- Juncos JP, Grande JP, Croatt AJ, et al. Early and prominent alterations in hemodynamics, signaling, and gene expression following renal ischemia in sickle cell disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298:F892-9.
- Ali Z, Troncoso JC, Fowler DR. Recurrent cerebral venous thrombosis associated with heterozygote methylenetetrahydrofolate reductase CT mutation and sickle cell trait without homocysteinemia: An autopsy case report and review of literature. *Forensic Sci Int;* 2014.
- Vigneri R. Diabetes: diabetes therapy and cancer risk. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5:651-2.
- Pauer J, Fek A, Buday B, et al. Metabolic alteration in healthy men with first degree type 2 diabetic relatives. *Orv Hetil.* 2013;154:178-86.
- Klotzbucher E. Glucagon hyperglycemia and disordered insulin utilization in diabetes mellitus in man. *Dtsch Gesundheitsw.* 1952;7:1487.
- Matkovic B, Varga SI, Szabo L, et al. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm Metab Res.* 1982;14:77-9.
- Lobner K, Fuchtenbusch M. Inflammation and diabetes. *MMW Fortschr Med.* 2004;146:32-3, 5-6.
- Sibireva OF, Kaliuzhin VV, Urazova OI, et al. The biochemical markers of endothelium dysfunction in patients with diabetic nephropathy. *Klin Lab Diagn.* 2012;8:11.
- Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C, et al. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res.* 2012;129:371-7.
- Gabbay IE, Gabbay M, Gabbay U. Diabetic foot cellular hypoxia may be due to capillary shunting--a novel hypothesis. *Med Hypotheses.* 2014;82:57-9.
- Levitt NS. Diabetes in Africa: epidemiology, management and healthcare challenges. *Heart.* 2008;94:1376-82.
- Tsaros G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, et al. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am J Med.* 2009;122:507-12.
- Franch-Nadal J, Roura-Olmeda P, Benito-Badorrey B, et al. Metabolic control and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes mellitus patients according to diabetes duration. *Fam Pract.* 2014.
- Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, et al. Comparison of Sebia Capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol.* 2008;130:824-31.
- Maniatis A, Frieman B, Bertles JF. Increased expression in erythrocytes ii antigens in sickle cell disease and sickle cell trait. *Vox Sang.* 1977; 33:29-36.
- Bain BJ. Haemoglobinopathy diagnosis: algorithms, lessons and pitfalls. *Blood Rev.* 2011;25:205-13.
- Ama V, Kengne AP, Nansseu NJ, et al. Would sickle cell trait influence the metabolic control in sub-Saharan individuals with type 2 diabetes? *Diabet Med.* 2012;29:e334-7.
- Bleyer AJ, Vidya S, Sujata L, et al. The impact of sickle cell trait on glycated haemoglobin in diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2010;27:1012-6.
- Aleyassine H. Glycosylation of hemoglobin S and hemoglobin C. *Clin Chem.* 1980;26:526-7.
- Abdella PM, Ritchey JM, et al. Glycosylation of hemoglobin S by reducing sugars and its effect on gelation. *Biochim Biophys Acta.* 1977;490:462-70.
- Abraham EC, Elseweidy MM. Non-enzymatic glycosylation influences Hb S polymerization. *Hemoglobin.* 1986;10:173-83.
- Abraham EC, Cameron BF, Abraham A, et al. Glycosylated hemoglobins in heterozygotes and homozygotes for hemoglobin C with or without diabetes. *J Lab Clin Med.* 1984;104:602-9.
- Ruiz-Reyes G. Fundamentos de Hematología. Panamericana; 1998. pp 31-44.
- Kaul DK, Liu XD. Rate of deoxygenation modulates rheologic behavior of sickle red blood cells at a given mean corpuscular hemoglobin concentration. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1999;21:125-35.
- Ajayi AA, Kolawole BA. Sickle cell trait and gender influence type 2 diabetic complications in African patients. *Eur J Intern Med.* 2004;15:312-5.
- Kolawole BA, Ajayi AA. Prognostic indices for intra-hospital mortality in Nigerian diabetic NIDDM patients. Role of gender and hypertension. *J Diabetes Complications.* 2000;14:84-9.