

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

IMPORTANCIA DE LA O-GLCNACILACIÓN EN LA INFECCIÓN POR

TRYPANOSOMA CRUZI

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. TORRES GUTIÉRREZ ELIA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. PAZ MARIA SILVIA SALAZAR SCHETTINO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CD . MX., NOVIEMBRE, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas.

A los proyectos DGAPA-PAPIIT: IT200913, IN227816 e IN216118.

A la Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino, por sus aportaciones académicas al desarrollo de este proyecto, por brindarme el apoyo para el desarrollo de los diferentes protocolos, por sus enseñanzas y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo, por su invaluable apoyo académico desde el inicio del proyecto, sus enseñanzas en glicobiología, sus aportaciones a la escritura y corrección del manuscrito y por siempre brindarme la orientación necesaria para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Carlos Rosales Ledezma, por sus atinadas y oportunas observaciones y recomendaciones y su disposición a brindar el apoyo académico necesario.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Martha Irene Bucio Torres por todas sus enseñanzas y su invaluable apoyo académico y económico para la realización de este proyecto. Gracias por su invaluable confianza y por ayudarme a formarme y crecer académicamente desde que llegue a este laboratorio.

A la Dra. Yobana Pérez Cervera adscrita a la Facultad de Odontología de la UABJO por brindarme el apoyo académico, metodológico y de insumos para el planteamiento y desarrollo del proyecto y sus aportaciones a la escritura del manuscrito.

A la Dra. Margarita Cabrera Bravo por su invaluable apoyo para iniciar este proyecto, para el planteamiento, por hacer posibles las colaboraciones y el desarrollo de este trabajo. Y especialmente por sus enseñanzas y la confianza que depositó en mí.

A la Biol. Olivia Reynoso Ducoing, por su gran apoyo y valiosas enseñanzas en las técnicas de electroforesis y western blot y por su disposición para asesorarme y ayudarme en la realización de estas metodologías.

Al Dr. Luc Camoin del Institut Paoli-Calmetes, Univ, Marseille, France, por su invaluable colaboración en las técnicas proteómicas y de espectrometría de masas .

A la M. en C. Yolanda Guevara Gómez, por proporcionar amablemente los cultivos de *T. cruzi* requeridos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Moyira Osny Aquino Gil por su apoyo en la estandarización del marcaje enzimático y en la realización de esta técnica.

A la M. en C. Mariana C. De Alba Alvarado por su apoyo técnico y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Tony Lefebvre por sus valiosas aportaciones al proyecto y manuscrito.

A la M. en C. Karen Julisa Loeza Reyes por su apoyo para la estandarización del marcaje con anticuerpos.

Al Dr. Carlos Josué Solorzano Mata, Profesor Investigador de la Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca y a la Dra. Adelma Escobar Ramírez Investigadora de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por su asesoría en la parte experimental de la inmunofluorescencia.

DEDICATORIAS

A mi amada familia:

Ivan, mi compañero de vida, que me ha acompañado todo este tiempo y siempre me apoya e impulsa a seguir adelante.

Leo, mi niño hermoso, que es mi motivo de grandes alegrías y mi motivación para superarme.

Mis papás y mi hermano, Elia, Melesio y Fernando que siempre me han apoyado en todas las formas posibles.

ÍNDICE

INDICE DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
• <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
• Respuesta adaptativa de <i>T. cruzi</i>	7
• Glicobiología de <i>T. cruzi</i>	8
• La <i>O</i> -GlcNAcilación	9
OBJETIVOS	12
ANTECEDENTES	
• <i>La O</i> -GlcNAcilación en organismos protistas	13
METODOLOGÍA	
• Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> en condiciones de cultivo estándar	15
• Obtención de extractos proteicos	15
• Electroforesis y western-blot	16
• Inmunoprecipitación	16
• Inmunofluorescencia	17
• Marcaje enzimático Click Chemistry	17
• Enriquecimiento de proteínas <i>O</i> -GlcNAciladas	17
• Digestión proteica	18

• Eliminación Beta	19
• Espectrometría de masas	19
• Identificación y cuantificación de proteínas	19
RESULTADOS	
• <i>Trypanosoma cruzi</i> expresa proteínas <i>O</i> -GlcNAcizadas	21
• Las condiciones ambientales influyen en el patrón de <i>O</i> -GlcNAcización de los epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	26
• Identificación de proteínas <i>O</i> -GlcNAcizadas en <i>T. cruzi</i>	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	40
APÉNDICE - Artículo requisito para la obtención del grado:	
• Identification of <i>O</i> -GlcNAcylated proteins in <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
ANEXO 1 – Ejemplo de la base de datos:	
• Proteínas <i>O</i> -GlcNAcizadas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACN:	Acetonitrilo
BCA:	Ácido bicinconínico
CTD 110.6:	Anticuerpo anti <i>O</i> -GlcNAc, IgM de ratón.
DAB:	Diamino bencidina
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol, marcador fluorescente de ADN
DTT:	Dithiothreitol, agente reductor
DTU:	Unidades discretas de clasificación
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
FITC:	Isothiocianato de Fluoresceína
GalNAz	N-azidoacetilgalactosamina-tetraacilada
GalT1 Y289L	Enzima Gal T1 mutante que adiciona residuos GalNAz
GlcNAc:	N-acetil glucosamina
GPI:	Glico fosfatidil inositol
GIPL:	glicoinositolfosfolípido
HCl:	Ácido clorhídrico
HRP:	Peroxidasa de rábano
HSP	Proteínas de choque térmico
IAA:	Iodoacetamida
LC:	Cromatografía líquida
MPT:	Modificación post traduccional
MS	Espectrometría de masas
NaCl:	Cloruro de sodio

OGA	Enzima que remueve el residuo GlcNAc de las proteínas
O-GlcNAc:	N-acetilglucosamina con union β
OGT	Enzima que adiciona residuos GlcNAc a serinas /treoninas de proteínas nucleares, citoplasmaticas y mitocondriales
PBS:	Buffer de fosfatos
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
RL2:	Anticuerpo monoclonal anti O-GlcNAc, IgG de ratón.
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SDS PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SUMOilación:	MPT que consiste la adición de ubiquitinas pequeñas (Small Ubiquitin)
TcTox:	Hemolicina de <i>T. cruzi</i>
TEAB:	Bicarbonato de Trietilamonio
TLR:	Receptores tipo Toll
Tris/HCl:	Tris (hidroximetil) aminometano hidrocioruro
UDP-GlcNAc	Molécula formada por un nucleótido (Uridina difosfato) y una acetilglucosamina, producto final de la ruta de síntesis de las hexoaminas

Importancia de la *O*-GlcNAcilación en la infección por *Trypanosoma cruzi*

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es endémica de América Latina y se ha dispersado a otros continentes por fenómenos migratorios. La diversidad en la severidad de las presentaciones clínicas ha sido atribuida al pleomorfismo del parásito. Diversas modificaciones post traduccionales (MPTs) han sido descritas en *T. cruzi*; sin embargo, hasta la fecha ningún estudio se ha enfocado en la *O*-GlcNAcilación, que consiste en la adición del monosacárido N-Acetil Glucosamina (GlcNAc) en residuos serina y treonina de diversas proteínas nucleares, citoplasmáticas y mitocondriales. La *O*-GlcNAcilación regula la función proteica de forma análoga a la fosforilación; de hecho, la interacción entre estas MPTs permite a la célula regular diversas funciones en respuesta a los nutrientes disponibles y las condiciones de estrés. En el presente trabajo se demostró la presencia de *O*-GlcNAcilación en proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* por tres métodos: unión a anticuerpos específicos en lisados y parásitos completos, por marcaje enzimático y por espectrometría de masas. Se identificaron 1271 proteínas *O*-GlcNAciladas putativas y 6 secuencias de modificación (Información disponible en la base de datos ProteomeXchange, ID PXD010285). La mayor parte de estas proteínas presentan funciones estructurales o metabólicas que son esenciales para el ciclo de vida y supervivencia del parásito. Adicionalmente, al someter a los epimastigotes a condiciones de estrés térmico y privación de glucosa, se observaron variaciones en los patrones de *O*-GlcNAcilación detectados por western-blot con anticuerpos específicos; lo cual, nos indica un posible función de esta MPT en la respuesta adaptativa. Debido a la cantidad de procesos en los que participa la *O*-GlcNAcilación, su identificación en proteínas de *T. cruzi* abre un nuevo campo de

investigación en la biología de los Tripanosomatidos, sus procesos de infección y a futuro puede ayudarnos a identificar blancos terapéuticos.

ABSTRACT

Originally an anthroponosis in the Americas, Chagas disease has spread from its previous borders through migration. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Differences in disease severity have been attributed to a natural pleomorphism in *T. cruzi*. Several post-translational modifications (PTMs) have been studied in *T. cruzi*, but to date no work has focused on *O*-GlcNAcylation, a highly conserved monosaccharide-PTM of serine and threonine residues mainly found in nucleus, cytoplasm, and mitochondrion proteins. *O*-GlcNAcylation is thought to regulate protein function analogously to protein phosphorylation; indeed, crosstalk between both PTMs allows the cell to regulate its functions in response to nutrient levels and stress. Herein, we demonstrate *O*-GlcNAcylation in *T. cruzi* epimastigotes by three methods: by using specific antibodies against the modification in lysates and whole parasites, by click chemistry labelling, and by proteomics. In total, 1271 putative *O*-GlcNAcyated proteins and 6 modification sequences were identified by mass spectrometry (data available via ProteomeXchange, ID PXD010285). Most of these proteins have structural and metabolic functions that are essential for parasite survival and evolution. Furthermore, *O*-GlcNAcylation pattern variations were observed by antibody detection under glucose deprivation and heat stress conditions, supporting their possible role in the adaptive response. Given the numerous biological processes in which *O*-GlcNAcyated proteins participate, its identification in *T. cruzi* proteins opens a new research field in the biology of Trypanosomatids, improve our understanding of infection processes and may allow us to identify new therapeutic targets.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, padecimiento de gran importancia en Latinoamérica. La Organización Panamericana de la Salud estima que existen aproximadamente 6 millones de individuos infectados y que actualmente esta enfermedad provoca cerca de 12 000 muertes al año, generando un costo en salud aproximado de 500 millones de dólares (USD) y una pérdida anual de 770 mil años de vida por muerte prematura o pérdida de años productivos por discapacidad (OMS & OPS, 2018; WHO, 2015). La forma cardíaca de la enfermedad es la más grave y frecuente, la desarrolla aproximadamente el 30% de los individuos infectados y puede llegar a causar falla cardíaca y muerte súbita. La enfermedad está asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda y se encuentra ampliamente difundida en las áreas rurales de Latinoamérica y en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades. Actualmente, se ha notificado con creciente frecuencia la transmisión por transfusión sanguínea, aun en países no endémicos, debido a los fenómenos masivos de migración (WHO, 2010) (Figura 1).

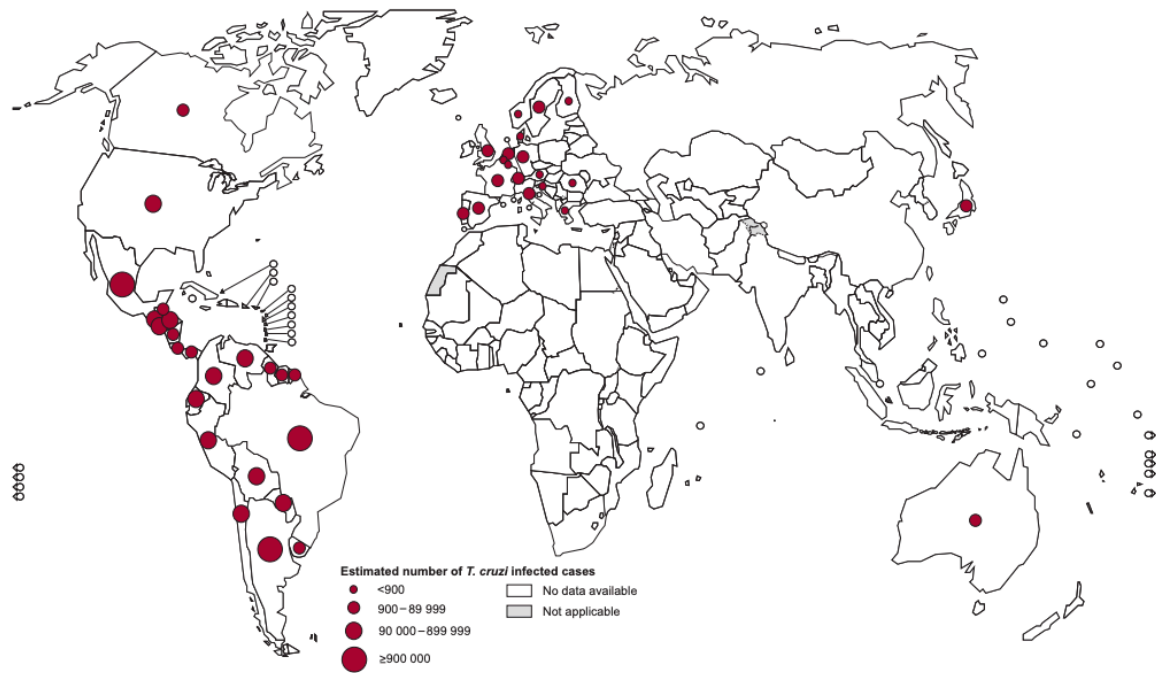
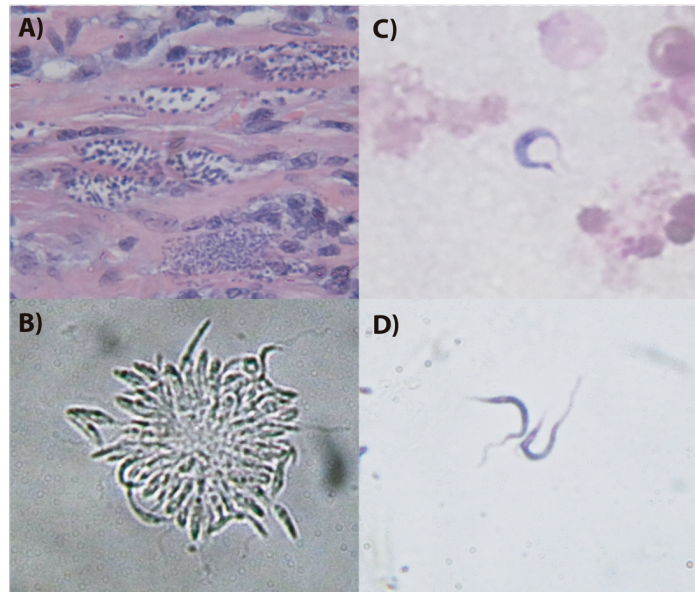


Fig 1. Distribución global de casos de Enfermedad de Chagas, basado en estimaciones oficiales 2006-2010. Tomado de WHO 2010

Trypanosoma cruzi

El protozoario *T. cruzi*, pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, se caracteriza por presentar un solo flagelo, un núcleo y un kinetoplasto. Su reproducción es asexual, por fisión binaria. Durante su ciclo de vida se distinguen tres estadios morfológicos principales:



□ Fig 2. Estadios morfológicos de *T. cruzi*. A) Amastigotes en musculo de ratón, B) Epimastigotes, C) Tripomastigote sanguíneo D) Tripomastigote metacíclico. Fotografías tomadas en el Laboratorio de Biología de Parásitos, FACMED, UNAM

de diámetro, su flagelo es corto. Es la forma de reproducción dentro de las células del mamífero (Figura 2B).

Epimastigotes (epi= anterior): son de forma oval alargada de 20 μm de largo; con el cinetoplasto en posición anterior al núcleo, de donde emerge el flagelo. Es la forma de reproducción en el insecto (Figura 2A).

Tripomastigotes (tripo= perforar), es la forma infectiva, flagelada, móvil de 18 μm de largo y sin capacidad reproductiva; se encuentra en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado (Figura 2C) y en la ampolla rectal del invertebrado (Figura 2D) (Maria Júlia M Alves & Colli, 2008).

Actualmente, se reconocen seis subgrupos genéticos de *T. cruzi* conocidos como unidades discretas de clasificación (DTU's por sus siglas en inglés); Tc I a Tc VI, y que pueden ser identificadas por un triple ensayo rDNA PCR y PCR-RFLP de los loci HSP60 y GPI (Zingales et al., 2009).

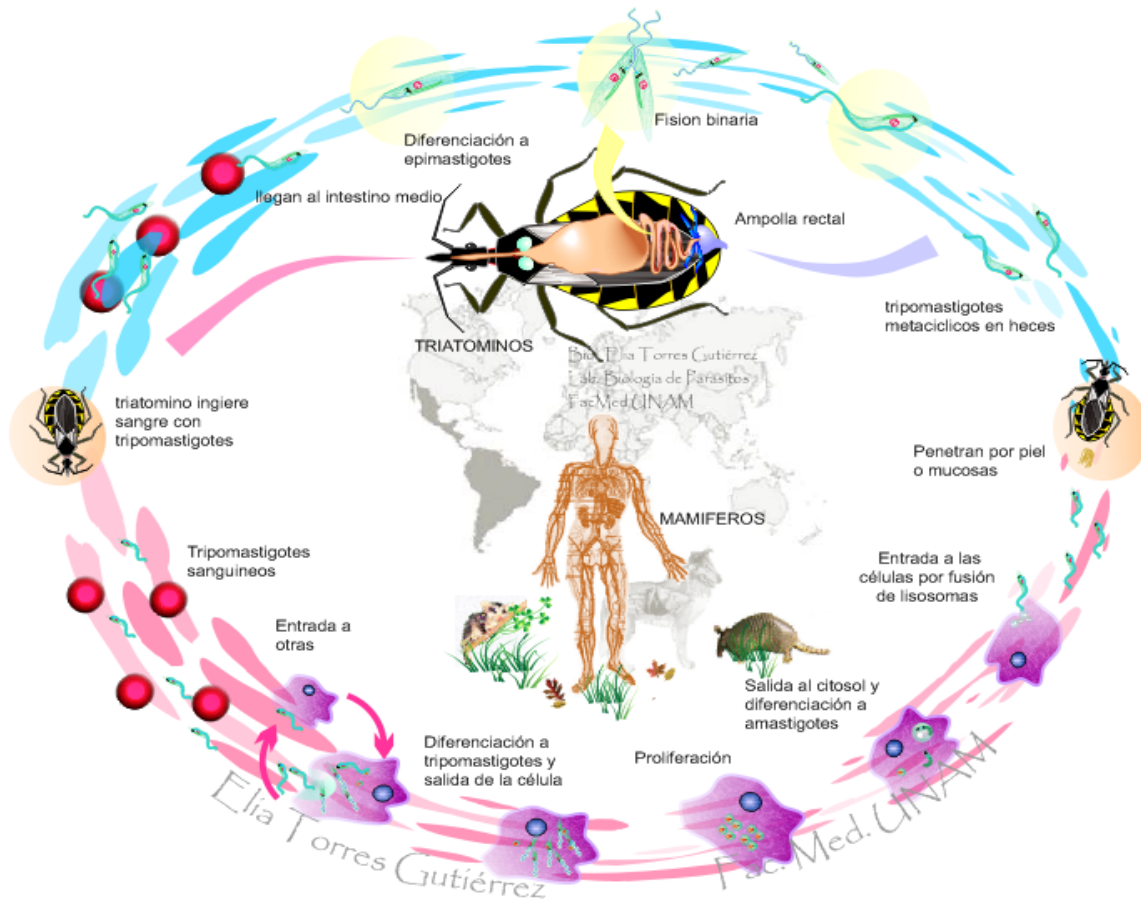


Fig 3. Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo ya que alterna entre dos huéspedes, un mamífero y un invertebrado (Figura 3). El insecto vector es un reduvido hematófago (Familia Reduvidae) de la subfamilia Triatominae que se caracteriza por presentar 5 estadios ninfales y la forma adulta, en cualquiera de estas etapas puede infectarse y transmitir el parásito. El huésped invertebrado (triatomino) ingiere sangre con tripomastigotes de un vertebrado infectado y una vez en el intestino medio se transforman en epimastigotes, se dividen por fisión binaria y se adhieren a las células del epitelio intestinal; en la ampolla rectal, una proporción de epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos que son eliminados en las heces.

Estos pueden penetrar a través de piel o mucosas del vertebrado y se adhieren a la superficie de las células (Rassi & Marin-Neto, 2010).

Después de la unión de *T. cruzi* con receptores en la superficie de la célula huésped, como los TLRs, el parásito induce una elevación local de la concentración de calcio en el citosol de la célula huésped, promoviendo la fusión de lisosomas, estos procesos permiten al parásito un rápido acceso al compartimento lisosomal y su internalización. Una vez dentro, el parásito secreta trans-sialidasas que remueve ácido siálico de las proteínas lisosomales y las transfiere a sus moléculas de superficie, cubriéndose con carbohidratos del huésped. El adverso ambiente lisosomal, desencadena la producción de la hemolisina TcTox, que contribuye a la destrucción de la vacuola. El parásito modifica su forma a amastigote, en la cual realiza el proceso de división por fisión binaria y después de varias rondas de replicación, los parásitos se transforman en tripomastigotes, incrementando su movimiento, terminando por romper la célula huésped, dejando libres a los tripomastigotes sanguíneos, que tienen la capacidad de invadir cualquier célula nucleada del mamífero (Burleigh & Woolsey, 2002; Cardoso, Reis-Cunha, & Bartholomeu, 2015).

Respuesta adaptativa de *T. cruzi*

Actualmente, se conoce la secuencia del genoma de los tres tripanosomatidos de importancia médica (Ash & Jasny, 2005; El-Sayed et al., 2005); sin embargo, debido a la escasa homología que presentan con otros organismos secuenciados, cerca de la mitad del proteoma predictivo no tiene una función conocida (J A Atwood et al., 2005). Las moléculas que más frecuentemente utilizan los organismos para responder al medio ambiente son las proteínas, dada su diversidad, sus funciones enzimáticas y la velocidad con que se puede modificar el proteoma que expresa en un momento dado. Los kinetoplastidos transcriben de forma

indiscriminada grandes cadenas de genes policistronicos, dejando el control de la expresión genética a nivel post transcripcional y post traduccional, por lo que su caracterización en estos organismos resulta de gran importancia (Clayton & Shapira, 2007; Marchini et al., 2011).

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) resultan indispensables en los mecanismos de respuesta al estrés, por ejemplo, los sistemas de transducción de señales y factores de transcripción. Se han realizado diversos acercamientos proteómicos que ofrecen evidencia experimental de la expresión genética de estos organismos a nivel de proteínas, así como de las MPTs que las regulan, como la fosforilación (Marchini et al., 2011; Queiroz et al., 2014), acetilación (Moretti, Cestari, Anupama, Stuart, & Schenkman, 2018), ubiquitinación (Gupta, Aggarwal, Singh, Yadav, & Khan, 2018), SUMOilación (Bayona et al., 2011) y diversas glicosilaciones.

Glicobiología de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi, como el resto de los tripanosomatidos, expresa diversos glicoconjugados, algunos de los cuales son esenciales para su supervivencia e infectividad; su composición varía según el estadio del ciclo de vida; es rico en glicoinositolfosfolipidos (GIPLs) tanto libres como anclando proteínas a la membrana plasmática. Los GIPLs libres son los principales constituyentes de la superficie celular, actuando como moduladores del sistema inmune del huésped y participan en la unión la superficie intestinal del insecto vector.

Las glicosilaciones consisten en la unión de azúcares a residuos de proteínas, son MPTs que por su diversidad incrementan la complejidad proteómica más que cualquier otra modificación. Cerca de la mitad de las proteínas que expresa una célula presentan algún tipo

de glicosilación. Las mucinas, son las glicoproteínas más abundantes de *T. cruzi* y están altamente *O*-glicosiladas; están involucradas en la protección contra las proteasas intestinales del vector y con la interacción e invasión de las células de mamíferos. También se ha descrito la presencia de N-glicoproteínas como las trans-sialidasas y cistein proteasas (James A. Atwood et al., 2006). Las trans-sialidasas son algunas de las proteínas más abundantes en el tripomastigote, su importancia radica en la incapacidad de *T. cruzi* de sintetizar ácido siálico, por lo que estas enzimas tienen la función de transferir ácido siálico de los sialoglicoconjugados del huésped a las β -galactosas de las mucinas que se encuentran en la superficie (Nardy, Freire-de-Lima, Pérez, & Morrot, 2016; Oliveira, Freire-de-Lima, Penha, Dias, & Todeschini, 2014).

La formación de los glicoconjugados ocurre por la acción de enzimas glicosil-transferasas, las cuales suelen encontrarse en el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi. Las reacciones de glicosilación requieren de la presencia de azúcares donadores que son formas activadas de carbohidratos, suelen ser sintetizadas en el citoplasma y emplearse ahí mismo o ser transportados al RE donde son usados como sustratos donadores en las reacciones de glicosilación. Los principales azúcares donadores en *T. cruzi* son: UDP-GlcNAc, GDP-Man, UDP-Glc, UDP-Galp y UDP-Galf y su síntesis ocurre principalmente a partir de glucosa (Turnock & Ferguson, 2007).

La *O*-GlcNAcilación

La UDP-GlcNAc es el sustrato de otro tipo de glicosilación, la *O*-GlcNAcilación, modifica residuos de los aminoácidos serina y treonina en proteínas nucleares, citoplasmáticas y mitocondriales (Torres & Hart, 1984). A diferencia de las *O* y *N* glicosilaciones, no ocurre

en retículo endoplásmico ni aparato de Golgi y su rápida adición y remoción están dadas por las enzimas intracelulares *O*-GlcNAc Transferasa (OGT) y *O*-GlcNAcasa (OGA) (figura 4). Gran cantidad de proteínas blanco de esta modificación también son fosforiladas, sugiriendo la presencia de sitios compartidos de reconocimiento y una mutua regulación. Esta glicosilación es sensible a la disponibilidad de nutrientes en el medio y en interacción con la fosforilación y otras modificaciones post-traduccionales, participa en la regulación de diversas funciones celulares como: transcripción, traducción, degradación proteica, respuesta al estrés, entre otras (Bond & Hanover, 2015).

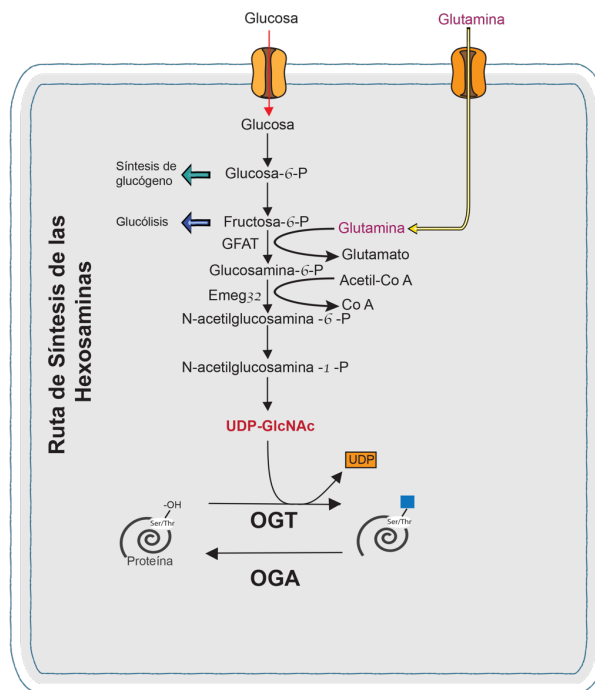


Figura 4: La *O*-GlcNAcilación depende del flujo de glucosa a través de la ruta de síntesis de las hexosaminas. La mayor parte de la glucosa celular es metabolizada por la glucólisis; sin embargo, entre el 2 y 3% entra en la ruta de síntesis de las hexosaminas produciendo UDP- GlcNAc. La glucosa es fosforilada e isomerizada, entrando en la ruta de síntesis como fructosa 6-fosfato para después convertirse en glucosamina -6 fosfato por acción de la glutamina:fructosa-6-fosfato aminotransferasa (GFAT). La adición del grupo acetil por la enzima Emeg32 es seguida por otra isomerización y adición de UTP para producir UDP-GlcNAc que es empleada por la *O*-GlcNAc transferasa (OGT) para agregar residuos N-acetil glucosamina a serinas (ser) y treoninas (thr) de las proteínas nucleares y citoplasmáticas, controlando su actividad, localización y estabilidad. La remoción del residuo *O*-GlcNAc es realizada por la *O*-GlcNAcasa (OGA). Imagen modificada de Lea Boudoin y Tarik Issad, 2015.

Esta modificación post-traducciona ha sido descrita en todos los organismos multicelulares donde se ha investigado, desde los hongos filamentosos, plantas, gusanos, insectos y diversos mamíferos, en el humano, se ha descrito su participación en diversas funciones como homeostasis metabólica, desarrollo, sistema inmune y respuesta al estrés (Baudoin & Issad, 2014; Bond & Hanover, 2015; Groves, Lee, Yildirim, & Zachara, 2013). Las alteraciones en la *O*-GlcNAcilación se han relacionado con el desarrollo de enfermedades como diabetes y Alzheimer (Groves et al., 2013; Vaidyanathan, Durning, & Wells, 2014).

Existen diversos acercamientos proteómicos para la detección, marcaje y enriquecimiento de proteínas con esta modificación post traducciona, los cuales han sido ampliamente revisadas en la literatura (Ma & Hart, 2014; Vercoutter-Edouart et al., 2015; Zachara, Vosseller, & Hart, 2011). En el presente trabajo se eligió realizar reconocimiento por anticuerpos específicos como RL2 y CTD 110.6 y el marcaje quimio-enzimático con la enzima Gal T modificada y click chemistry, técnicas que han sido empleadas con éxito en diversos organismos, incluyendo protistas (Aquino-Gil et al., 2018; Hahne et al., 2013).

OBJETIVOS

Demostrar la presencia de proteínas *O*-GlcNAcizadas en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Comparar el perfil de proteínas *O*-GlcNAcizadas en condiciones normales, de estrés térmico y disponibilidad de glucosa en el medio.

Identificar las proteínas *O*-GlcNAcizadas presentes en epimastigotes de *T. cruzi* por espectrometría de masas.

ANTECEDENTES

La O-GlcNAcilación en organismos protistas

La O-GlcNAcilación ha sido ampliamente estudiada en organismos pluricelulares; sin embargo, en los eucariontes unicelulares el conocimiento sobre su presencia y función es escaso. En una búsqueda bioinformática específica de esta modificación post traduccional, se localizaron secuencias homólogas de la enzima OGT y se comprobó su actividad en presencia de UDP-GlcNAc radio-marcado en los protistas: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* y *Dictyostelium discoideum* (Banerjee, Robbins, & Samuelson, 2009).

En *Toxoplasma gondii*, se determinó la secuencia TGGT1_112580 como putativa de la enzima OGT y se detectó por western blot con anticuerpos específicos. La detección de un patrón de proteínas O-GlcNAciladas se realizó con el anticuerpo RL2 y CTD 110.6 y se corroboró la O-GlcNAcilación de HSP 70 por inmuno precipitación (Perez-Cervera et al., 2011). En un trabajo posterior, por enriquecimiento con la lectina sWGA y marcaje con click chemistry se identificaron 357 proteínas O-GlcNAciladas en *T. gondii*, relacionadas con funciones diversas, incluyendo de respuesta al choque térmico y robtrias que son indispensables en el proceso de invasión (Aquino-Gil et al., 2018).

En *Plasmodium falciparum*, inicialmente se reporta la posible presencia de esta modificación en un estudio donde se emplearon eritrocitos infectados para la detección de O-glicanos (Dieckmann-Schuppert, Bause, & Schwarz, 1993). Posteriormente, se reportó un patrón proteínas O-GlcNAciladas detectado por western blot con los anticuerpos RL2 y CTD 110.6 (Perez-Cervera et al., 2011). Y recientemente, se confirmó que *P. falciparum* posee reservas de UDP - GlcNAc y se identificaron por espectrometría de masas 13 proteínas O-

GlcNAcyladas involucradas en la glicólisis, plegamiento proteico y estructura celular (Kupferschmid et al., 2017).

Determinar la presencia de la *O*-GlcNAcylación en proteínas de protistas parásitos como *T. cruzi*, e identificar las proteínas modificadas permitirá vislumbrar el papel que desempeñan en la adaptación al ambiente y supervivencia del parásito, abriendo un nuevo campo en la búsqueda de marcadores biológicos y posibles blancos terapéuticos.

METODOLOGÍA

Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en condiciones de cultivo estándar.

Los epimastigotes de la cepa Qro (ITRI/MX/86/QRO) de *T. cruzi* fueron cultivados en medio RPMI 1640 el cual contiene 11.5 mM de glucosa y se suplementa con 10% de suero fetal bovino. La temperatura de incubación es de 28°C. Se cosecharon en la fase estacionaria del crecimiento.

Estrés térmico: Se sembraron 1 millón de epimastigotes por mL de medio de cultivo RPMI 1640. Se incubaron a 28 o 37°C por 4 días y se realizó la cosecha y 3 lavados con PBS pH 7.2 centrifugando a 2500 xg por 20 min a 4° C.

Disponibilidad de glucosa: Se incubaron 1 millón de epimastigotes por ml a 28°C en frascos de cultivo con medio RPMI 1640 suplementado con SFB 10% y diferentes concentraciones de glucosa: 0, 5.5, 11.5 o 17 mM durante 5 días (Tyler & Engman, 2000). Posteriormente se realizó la cosecha y 3 lavados con PBS pH 7.2 al centrifugar a 2500 x g por 20 min a 4° C.

Obtención de extractos proteicos

Los parásitos se concentraron y lavaron con PBS pH 7.2 por centrifugación. La masa parasitaria se incubó con buffer de lisis pH 7.4 (Tris HCl 10mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas). Se centrifugó a 20000 g por 10 min y se separó el sobrenadante. Se determinaron las concentraciones proteicas totales por el método del ácido bicinonínico (BCA) (Walker, 1994).

Electroforesis y western-blot

La separación de los componentes proteicos se realizó por electroforesis en geles de acrilamida al 12% en condiciones reductoras. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie y otros se transfirieron a membranas de PVDF. Se incubó en solución de bloqueo al 5% (blotting-grade blocker Bio-Rad) en TBS (Tris-buffered Saline)- Tween 0.05% por 30 min. Los anticuerpos primarios anti *O*-GlcNAc CTD 110 y RL2 (Abcam ab2739), se incubaron por toda la noche a 4° C. Los anticuerpos primarios y secundarios, anti-ratón IgM e IgG respectivamente, fueron diluidos en TBS-Tween, y la detección se realizó por quimioluminiscencia (Perez-Cervera et al., 2011).

Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se realizó por medio de perlas magnéticas, siguiendo las instrucciones del fabricante (SureBeads Protein G magnetic beads 161-4023, Bio-Rad, California, USA). Se diluyeron 10 µg del anticuerpo anti-tubulina DM1A (T6199, Sigma, St. Louis Missouri, USA) en 200 µL de PBS-Tween 0.1% y se incubaron con las perlas magnéticas por 10 min a temperatura ambiente, se magnetizaron y se descartó el sobrenadante. Después de 3 lavados, se agregaron 500 µL de lisado de epimastigotes y se incubó por 1 hora. Se realizaron 3 lavados y las perlas fueron transferidas a un nuevo tubo. Finalmente, se agregaron 40 µL de Buffer de Laemmli 1x, se incubó por 10 min a 70° C. Las proteínas resultantes se separaron por electroforesis y se realizó western blot con anti-*O*-GlcNAc RL2 como anticuerpo primario. El anticuerpo secundario fue anti-ratón conjugado a peroxidasa y el revelado se realizó con DAB (HRP color development reagent Bio-Rad).

Inmunofluorescencia

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron fijados con paraformaldeido al 4% en PBS, incubándolos por 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. La permeabilización de las células se realizó con Tween 20 al 0.1% por 90 min. Se incubaron con albúmina sérica bovina al 1% para el bloqueo de sitios inespecíficos. El anticuerpo RL2 se agregó en dilución 1:50 en PBS y se incubó durante la noche. Se realizaron 3 lavados y se agregó el anticuerpo anti-mouse-FITC (1:100 en PBS) por 1 hora y posteriormente se fijaron en portaobjetos con el reactivo Fluoro Shield DAPI (F6057, Sigma). La observación se realizó en un microscopio Leica DM2000 con cámara DFC310 FX. Las imágenes se procesaron con el software Image J (Escobar-Ramirez, 2008).

Marcaje enzimático Click Chemistry

El sistema de marcaje enzimático Click- it (Invitrogen C33368) consiste en la transferencia de galactosa modificada con un azida (GalNaz) a los residuos *O*-GlcNAc de las proteínas empleando la enzima B-1,4 galactosiltransferasa (Gal T1 Y289L). Como control negativo se emplea el extracto proteico sin tratamiento enzimático y como control positivo, la proteína α -cristalina purificada, la cual posee un porcentaje de *O*-GlcNAcilación entre el 2 y 10%. El marcaje enzimático se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y para la detección de las proteínas marcadas se empleo el Click- it Biotin Protein Analysis Detection Kit (Invitrogen C33372) (Aquino-Gil et al., 2018).

Enriquecimiento de proteínas *O*-GlcNAcIladas

El marcaje enzimático por Click Chemistry se realizó al seguir las instrucciones del fabricante y los antecedentes en la literatura (Hahne et al., 2013).

Una vez realizado el marcaje con la GalNaz, las proteínas fueron enriquecidas por captura covalente en una resina alquilada por una reacción de click chemistry, al emplear el Click-it Protein Enrichment Kit (Invitrogen C10416). Esta técnica emplea cobre para promover la reacción de adición cíclica entre la azida y el alquilo terminal, lo cual generó una unión covalente. Una vez que se completó la reacción, las proteínas *O*-GlcNAcizadas, unidas a las perlas de resina fueron reducidas con DTT por 30 min a 55 °C y alquiladas con iodoacetamida 50 mM (IAA) por 60 min a temperatura ambiente. La resina fue sometida a un extenso proceso de lavado en columna: 5 lavados con 1.5 mL de buffer de lavado con (Tris/HCl 100 mM, pH 8; SDS 1%; NaCl 250 mM; EDTA 5 mM); 5 lavados con 1.5 mL de buffer de Urea (urea 8 M; Tris/HCl 100 mM, pH 8); 10 lavados con 1.5 mL de acetonitrilo al 20% (ACN) y 2 lavados con 1 mL de buffer de digestión (TEAB 100 mM, pH 8.2; ACN 10%).

Digestión proteica

Se realizó digestión enzimática de las proteínas unidas a la resina al incubar toda la noche en 200 µL de buffer de digestión con una mezcla de 1 µg de Tripsina/Lis-C; se descartó el sobrenadante y se lavó la resina con 500 µL de agua desionizada. Se conservaron ambas soluciones, una con los péptidos no retenidos y la que contenía las proteínas *O*-GlcNAcizadas. Posteriormente, la resina fue lavada en dos ocasiones con agua, seguida de dos lavados con buffer de desfosforilación (Tris/HCl 50 mM; NaCl 100 mM pH 7.6; DTT 1 mM; MgCl₂ 10 mM; MnCl₂ 1 mM). Los péptidos no retenidos fueron desalinizados en columnas de fase reversa C18 y secados en un sistema de vacío centrífugo previo a la espectrometría de masas.

Eliminación Beta

Con el objetivo de confirmar los sitios de *O*-GlcNAcilación, se realizó un proceso de desfosforilación en la resina, por lo cual, todos los péptidos unidos a la resina estarían *O*-GlcNAcilados. Los péptidos unidos a la resina fueron desfosforilados a 37 °C por 6 horas en 400 µL de buffer de desfosforilación, se lavó dos veces con 1.5 mL de agua y el volumen remanente se ajustó a 300 µL con agua. Se realizó la reacción de eliminación β, empleando el GlycoProfile β-elimination Kit (Sigma Aldrich). Se descartaron las perlas de agarosa y la solución con los péptidos fue desalinizada en columnas de fase reversa C18 y secada en un sistema de vacío centrífugo previo a la espectrometría de masas.

Espectrometría de masas

Las muestras fueron reconstituidas con ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo al 4% y analizadas por cromatografía líquida (LC) seguida de espectrometría de masas (MS/MS) en un equipo Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany) alineado con un Ultimate 3000RSLC nano chromatographic system (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA). Estos procedimientos fueron realizados en la Unidad de Espectrometría de masas del Institut Paoli-Calmettes y el Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marsella, Francia.

Identificación y cuantificación de proteínas

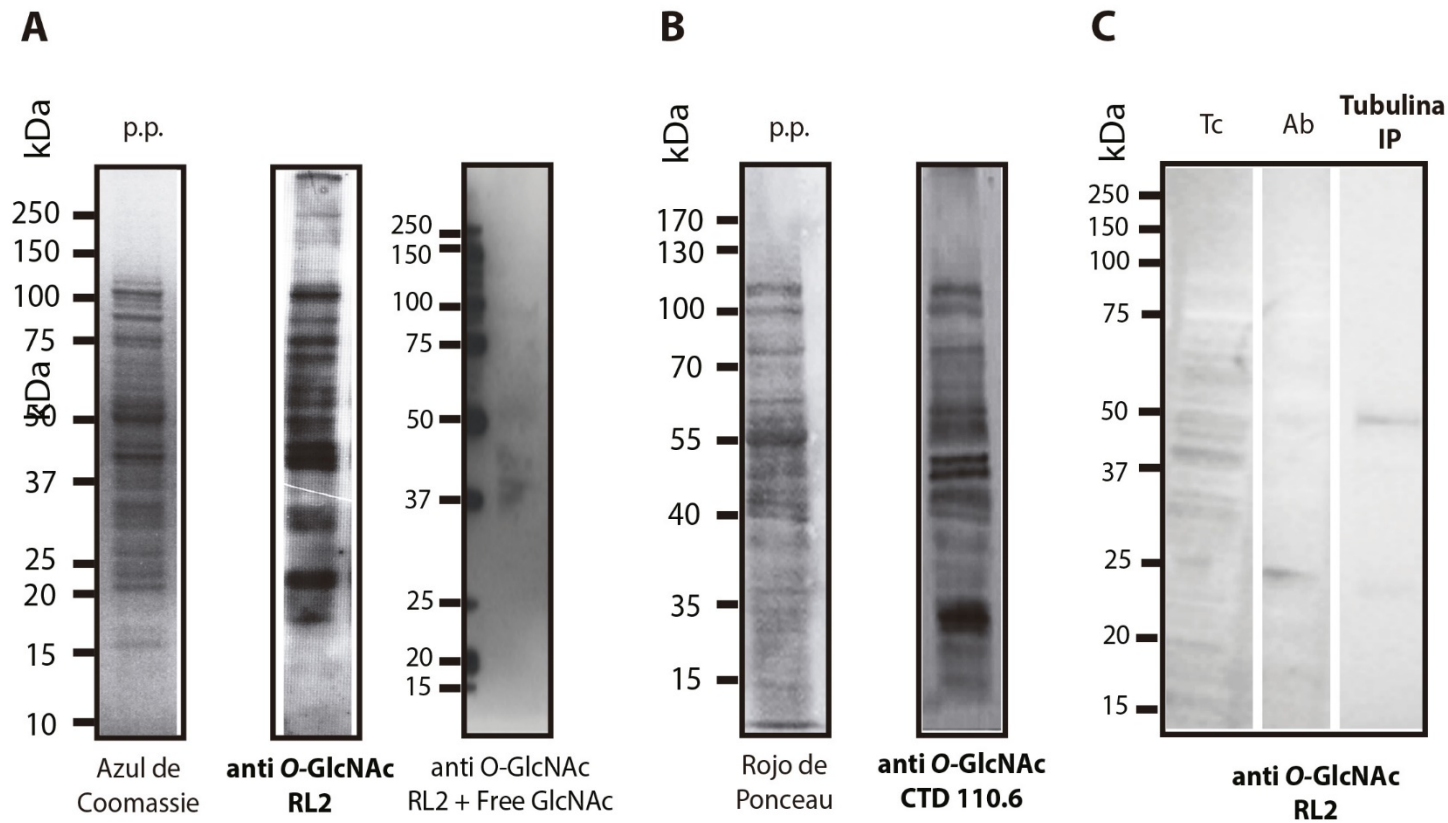
Los datos adquiridos de la espectrometría de masas fueron procesados con el software Proteome Discoverer v.1.4.1.14 (Thermo Fisher Scientific). Se realizó la búsqueda de datos por medio de SEQUEST HT con la base de datos proteómicos Uniprot para *T. cruzi*. Se

calculó la tasa de falsos hallazgos (FDR) con el programa Percolator, al establecer el valor de q en 1 y 5 % para definir los péptidos de alta y baja confianza y las proteínas fueron identificadas con al menos dos péptidos. De forma adicional, se estableció un punto de corte con base en el área MS, por lo que las proteínas con las intensidades más bajas, cuya suma fue de 7×10^8 fueron consideradas como posible fondo. La abundancia de las proteínas identificadas se determinó por el método TOP 3. Los datos proteómicos obtenidos, fueron depositados en el consorcio ProteomeXchange por medio del repositorio PRIDE con el número de identificación PXD0110285.

RESULTADOS

***Trypanosoma cruzi* expresa proteínas O-GlcNAcizadas**

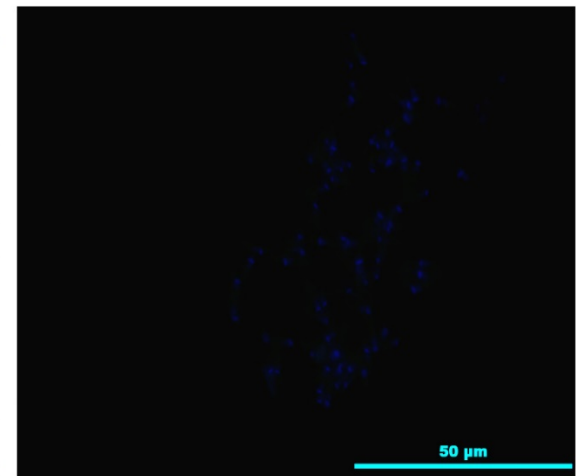
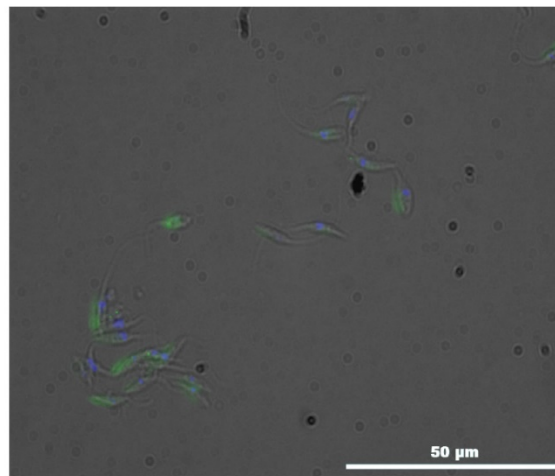
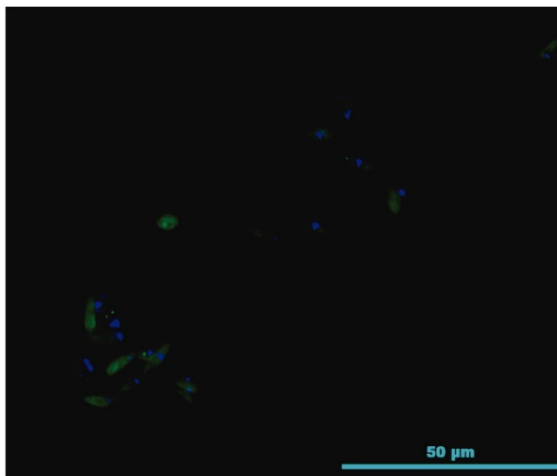
Desde la primer descripción de la O-GlcNAcización en 1984, se han empleado diferentes técnicas para su detección, entre las que destacan el uso de anticuerpos y la adición enzimática usando Gal T. En el presente trabajo se emplearon ambas técnicas para visualizar el O-GlcNAc de *T. cruzi*. El uso de los anticuerpos RL2 (Figura 5A) y CTD110.6 (Figura 5B) reconoció un amplio rango de proteínas con pesos moleculares entre 10 y 250 kDa en los extractos de epimastigotes. Una vez evidenciada la modificación post traduccional, se confirmó su presencia en alfa tubulina, siguiendo un protocolo de inmunoprecipitación. La tubulina, fue previamente descrita como O-GlcNAcizada en otros organismos protistas (Kupferschmid et al., 2017). La O-GlcNAcización de esta proteína fue evidenciada por anticuerpo RL-2 también se exhibió la O-GlcNAcización en epimastigotes completos, donde se observa la fluorescencia en la región citoplasmática (Figura 6).



□ Fig 5. Detección de proteínas *O*-GlcNAcyladas por anticuerpos: A) RL2. Perfil proteico (p.p.) de epimastigotes en SDS PAGE teñido con azul de Coomassie y western blot con el anticuerpo RL2 y control con el anticuerpo incubado en solución de GlcNAc. Revelados por quimioluminiscencia B) CTD 110.6. Perfil proteico de epimastigotes (p.p.) en SDS PAGE transferido a membrana de nitrocelulosa teñido con rojo de Ponceau y western blot con el anticuerpo CTD 110.6. Revelado por quimioluminiscencia. C) Inmunoprecipitación de alfa tubulina de epimastigotes de *T. cruzi* (anticuerpo DM1A) en western blot con anticuerpo RL2. Tc, lisado de epimastigotes; Ab, anticuerpo DM1A; Tubulina IP, tubulina inmunoprecipitada.

**anti O-GlcNAc (RL2)
anti ratón FITC/DAPI**

anti ratón FITC/DAPI



combinado con la imagen
obtenida con luz blanca

□ Fig 6. Detección de proteínas O-GlcNAc por Inmunofluorescencia en epimastigotes de *T. cruzi*. El anticuerpo primario fue RL2 y anticuerpo secundario de ratón conjugado a FITC, se observa en color verde. Los núcleos se observan en azul (DAPI)

Para confirmar la presencia de proteínas *O*-GlcNAcizadas en epimastigotes de *T. cruzi*, se empleó la enzima modificada GalT1 Y289L que adiciona residuos GalNAz a los péptidos *O*-GlcNAcizados, seguida de la adición de alquilos biotinilados que permiten su detección por el sistema avidina – peroxidasa (Figura 7A). Esta técnica permitió detectar proteínas *O*-GlcNAcizadas de epimastigotes de *T. cruzi* con pesos moleculares entre 100 y 40 kDa (Figura 7B).

Estos resultados demuestran por primera vez, la presencia de la *O*-GlcNAcización en *T. cruzi* ya que no existen reportes previos en ningún organismo de la clase Kinetoplastea, a la cual también pertenecen otros parásitos de importancia médica como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania spp.*

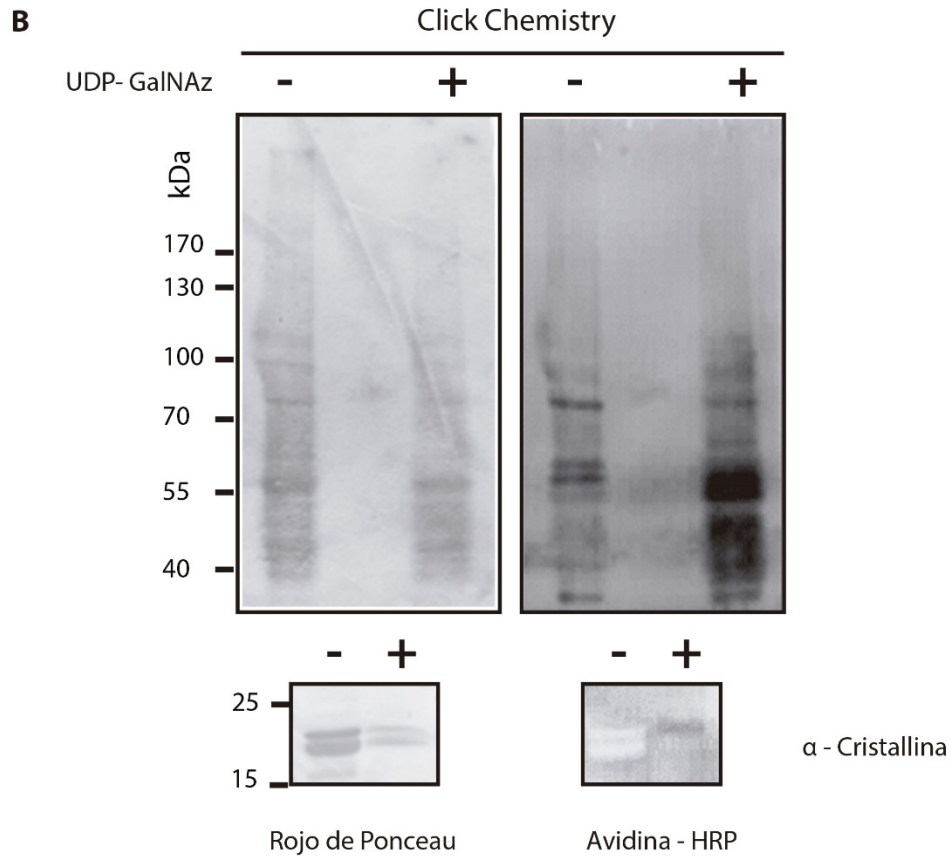
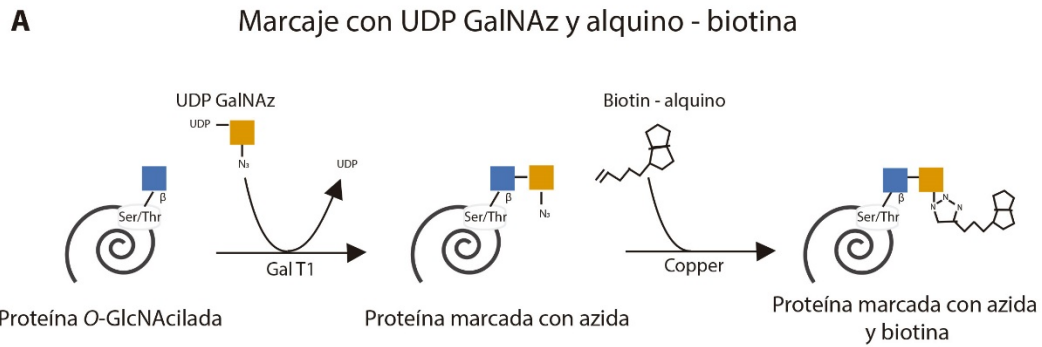
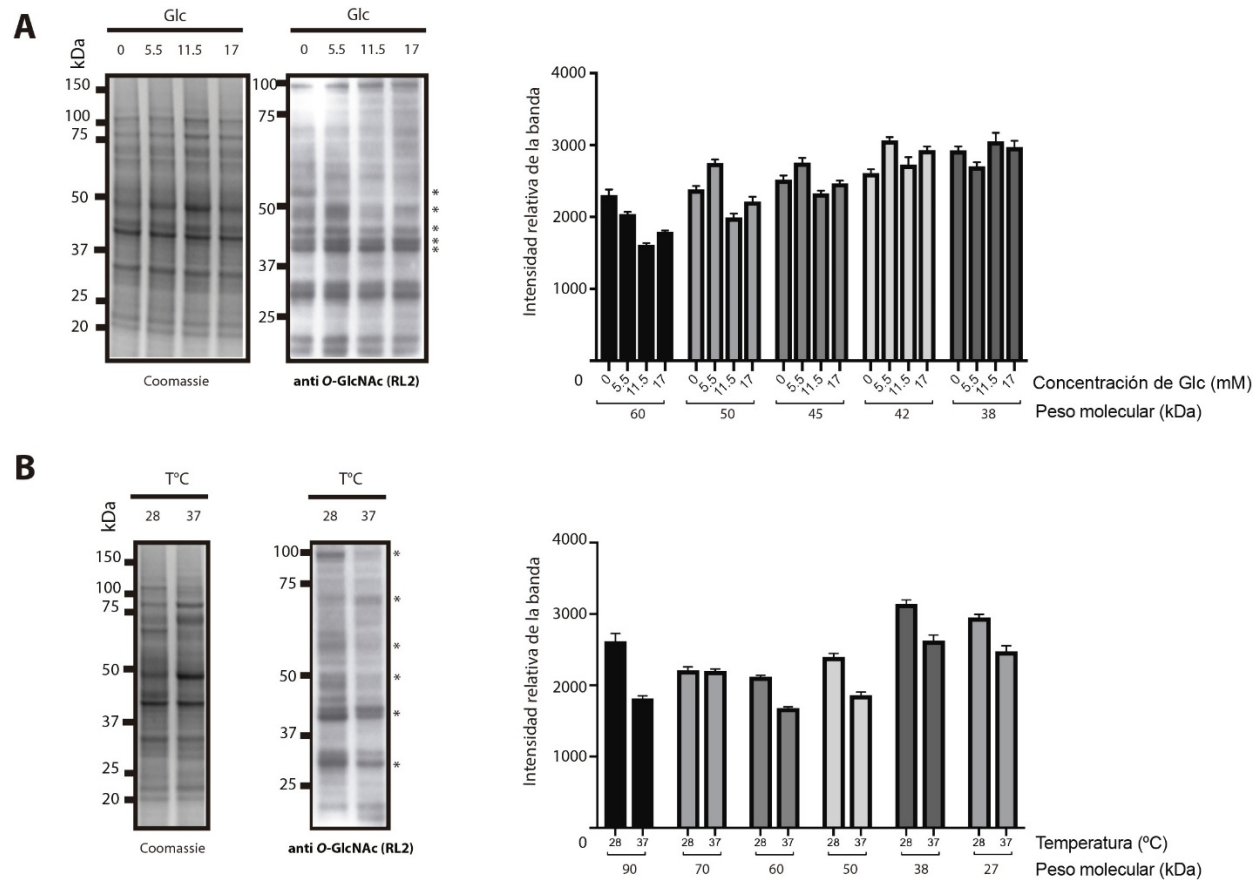


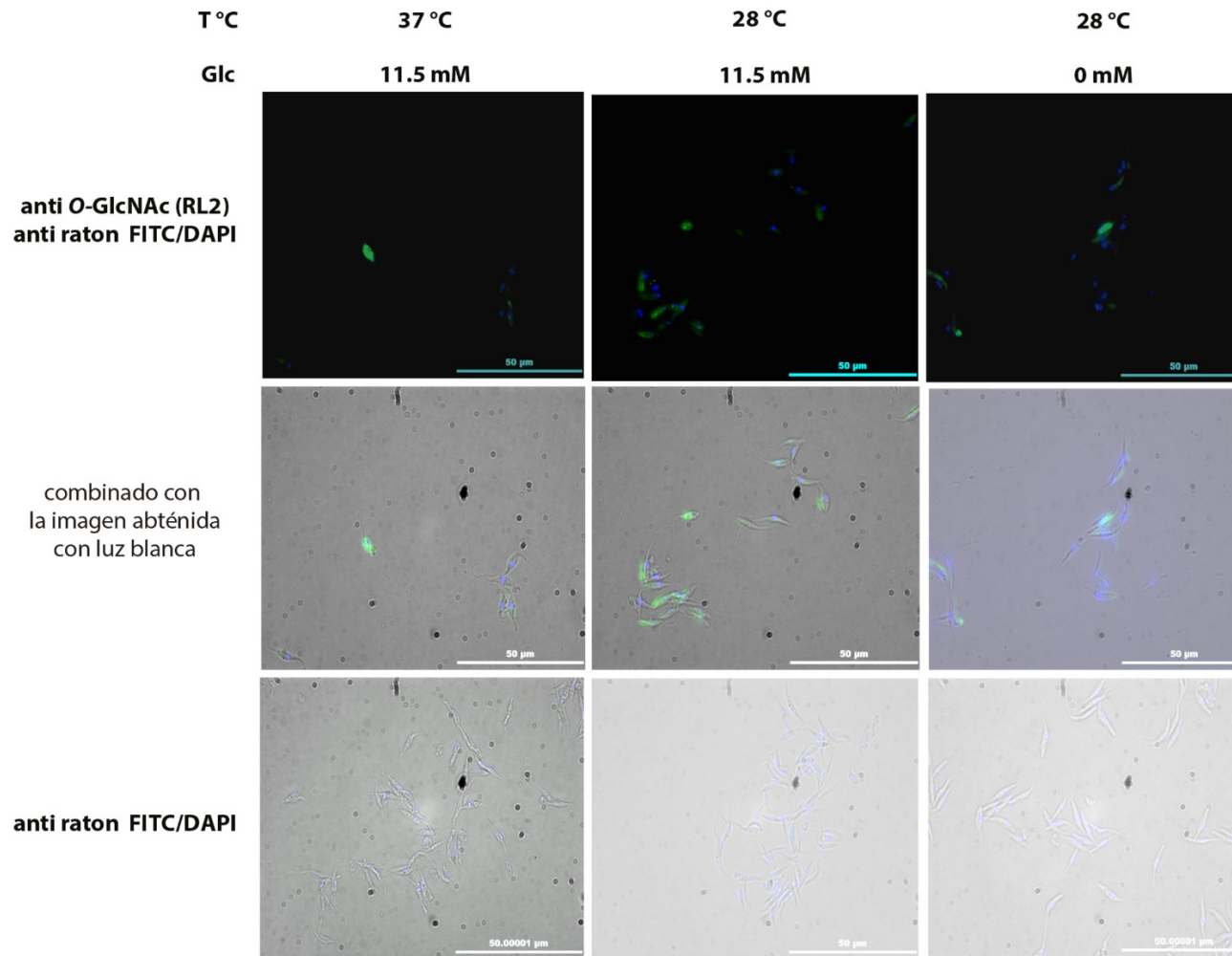
Fig 7. Detección enzimática de proteínas O-GlcNAciladas de epimastigotes de *T. cruzi*. A) Esquema del marcaje de proteínas O-GlcNAciladas con GalNAz y alquino – biotina por Click chemistry (Click iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System y Glycoprotein Detection Kit.). B) Despues del marcaje, se realizó electroforesis SDS PAGE y western blot con avidina conjugada a peroxidasa (HRP). El patrón proteico se observa en la membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. Se empleo alfa cristalina como control negativo.

Las condiciones ambientales influyen en el patrón de *O*-GlcNAcilación de los epimastigotes de *T. cruzi*

Una de las características de la *O*-GlcNAcilación es su sensibilidad a las condiciones ambientales, por lo cual, se sometió a los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* a variaciones en las condiciones de temperatura y disponibilidad de glucosa. En las condiciones ensayadas, se detectó la presencia de proteínas *O*-GlcNAciladas por western blot (Figura 8) e inmunofluorescencia (Figura 9); sin embargo, el patrón proteico en condiciones de baja disponibilidad de glucosa (0- 5.5 mM) mostró una mayor intensidad en los componentes de 60, 50 y 45 kDa. El componente de 42 kDa mostró mayor *O*-GlcNAcilación cuando el parásito disponía de 5.5 mM de glucosa (Figura 8A). Por el contrario, en condiciones de estrés térmico (37°C) la mayoría de los componentes mostró menor *O*-GlcNAcilación, con excepción del componente de 70 kDa como se observa en la figura 8.



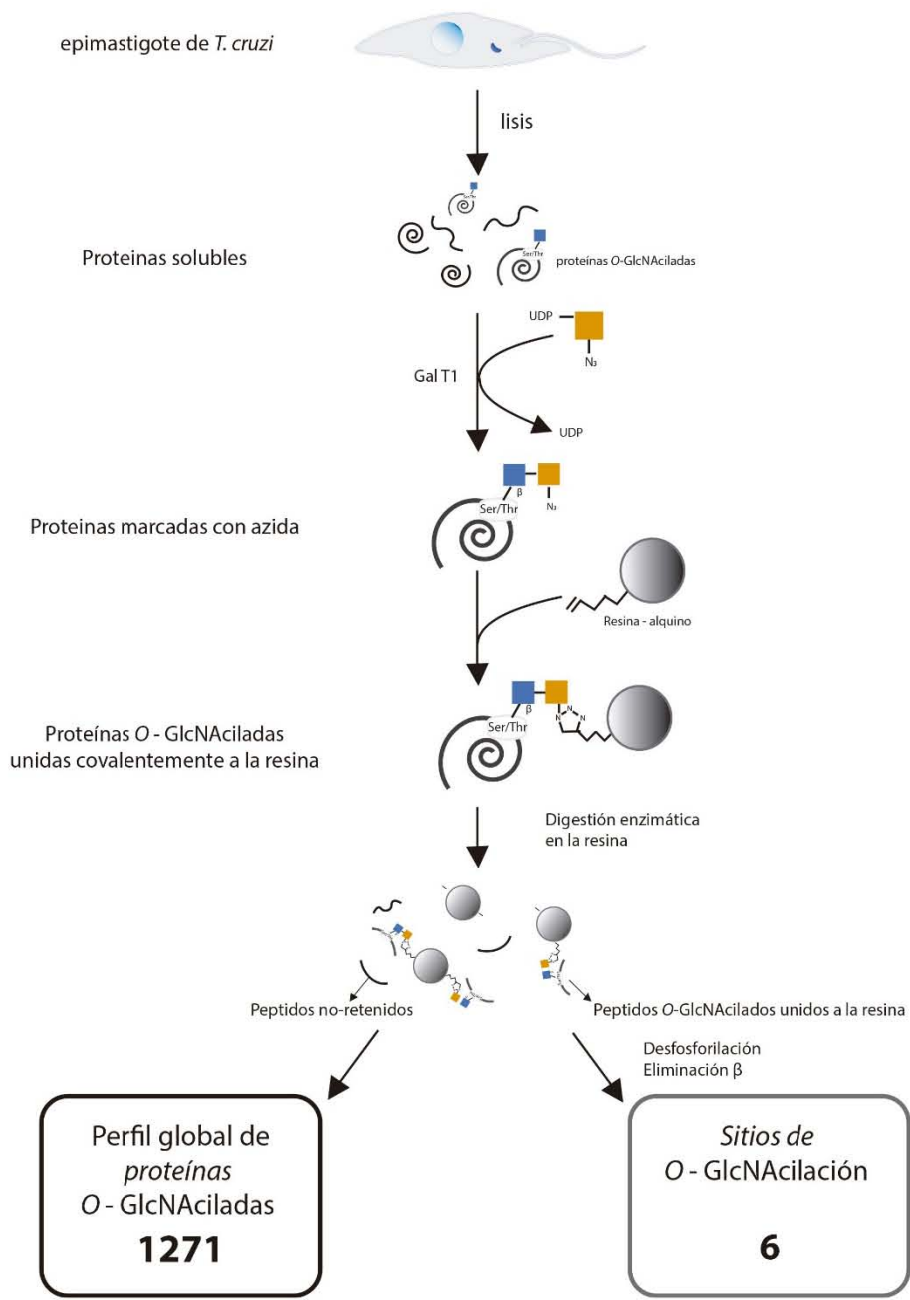
□ Fig 8. Epimastigotes de *T. cruzi* en diferentes condiciones de disponibilidad de glucosa (Glc) y estrés térmico. A) Perfil proteico (Coomasie) y de proteínas *O*-GlcNAcililadas de epimastigotes de *T. cruzi* en medio con diferentes concentraciones de glucosa (Glc): 0, 5.5, 11.5 y 17 mM (la concentración estándar es 11.5 mM). Densitometria de las bandas marcadas (*). B) Perfil proteico (Coomasie) y de proteínas *O*-GlcNAcililadas de epimastigotes de *T. cruzi* en estrés térmico a 37°C (La temperatura de incubación estándar es de 28°C). Inmunofluorescencia Densitometria de las bandas marcadas (*).



□ Fig 9. Inmunofluorescencia de epimastigotes de *T. cruzi* en condiciones de escasa disponibilidad de glucosa (Glc 0 mM) y estrés térmico a 37°C. Las condiciones estándar de incubación son: 11.5 mM de glucosa y 28°C. Se empleó RL2 como anticuerpo primario y anticuerpo secundario de ratón conjugado a FITC.

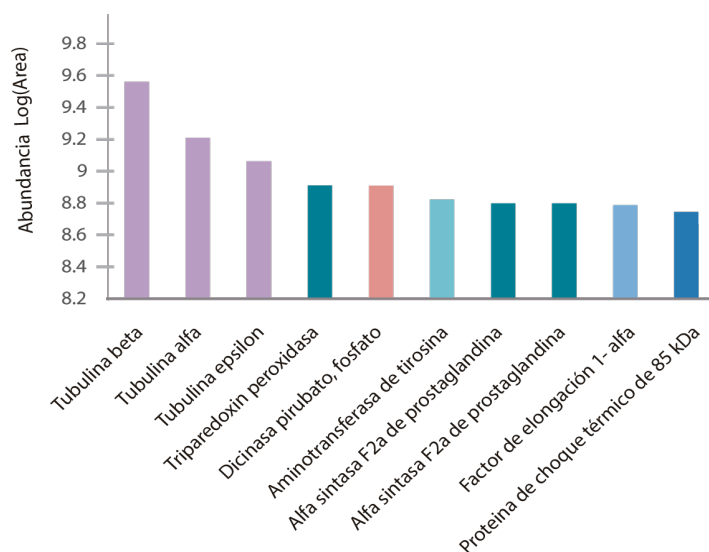
Identificación de proteínas *O*-GlcNAcizadas en *T. cruzi*

Una vez confirmada la presencia de la *O*-GlcNAcización en *T. cruzi*, se decidió establecer la identidad de las proteínas modificadas. Se han descrito diversos métodos para el enriquecimiento de proteínas *O*-GlcNAcizadas, incluyendo las basadas en la unión a anticuerpos o lectinas; y en los últimos 10 años, las técnicas basadas en las reacciones de click chemistry han mostrado una elevada sensibilidad. En el presente trabajo se utilizó la reacción de click chemistry para el marcaje de las proteínas *O*-GlcNAcizadas con una galactosa-azida, seguida de un proceso de purificación con una resina- alquilo (Figura 10). La proteólisis de los péptidos unidos a la resina, seguida de la espectrometría de masas LC-MS/MS, permitió la identificación de 1271 proteínas *O*-GlcNAcizadas putativas con una tasa de falso descubrimiento (FDR) del 5% y eliminando las proteínas con menores intensidades, las cuales se consideran como de fondo.

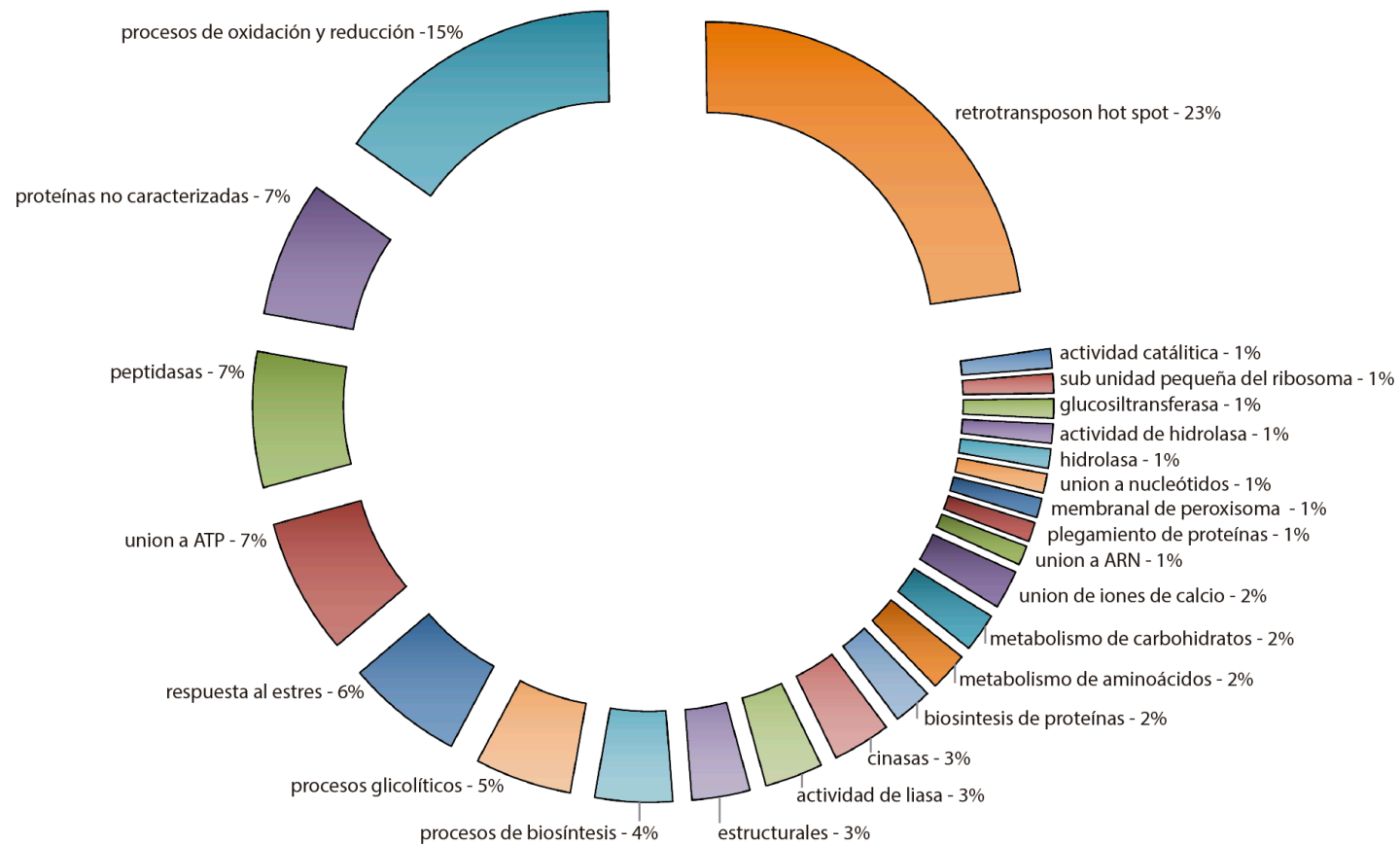


□ Fig 10. Esquema que muestra la estrategia experimental de marcaje enzimático y enriquecimiento de proteínas O-GlcNAcyladas basado en Click Chemistry e identificación por espectrometría de masas

Las proteínas identificadas corresponden a un amplio rango de funciones biológicas y participan en diversas funciones celulares. De las 10 proteínas *O*-GlcNAcizadas más abundantes, tres son constitutivas de citoesqueleto (tubulina alfa, beta y épsilon), tres participan en procesos de oxidación-reducción (triparedoxin peroxidasa y 2 Sintasa de prostaglandina) y el resto incluye cinasas y proteínas que participan en biosíntesis y respuesta al estrés (Figura 11). La clasificación funcional de las 100 proteínas *O*-GlcNAcizadas mas abundantes se muestra en la Figura 12. La base de datos completa se encuentra disponible en ProteomeXchange con el numero de identificación PXD010285 y como archivo suplementario en el artículo resultado de este proyecto y se muestra parcialmente en el Anexo 2.



□ Fig 11. Gráfico que muestra las 10 proteínas *O*-GlcNAcizadas mas abundantes en epimastigotes de *T. cruzi*



□ Fig 12. Grafico de la clasificación funcional de las 100 proteínas *O*-GlcNAcyladas más abundantes de epimastigotes de *T. cruzi*

DISCUSIÓN

La *O*-GlcNAcilación ocurre en todos los organismos pluricelulares y también se ha descrito en organismos mas simples como virus y bacterias; a pesar de esto, los reportes de esta MPT en protistas son escasos, e incluyen a *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* (Aquino-Gil et al., 2018; Banerjee et al., 2009; Kupferschmid et al., 2017; Perez-Cervera et al., 2011). Hasta el presente trabajo, no se había reportado esta *O*-GlcNAcilación en *T. cruzi* o en algún otro organismo de la clase Kinetoplastea. En el presente trabajo, se demuestra la presencia de proteínas *O*-GlcNAciladas en epimastigotes de *T. cruzi* y se determinó la identidad de 1271 proteínas *O*-GlcNAciladas putativas. Sorprendentemente, solamente 6 sitios de modificación pudieron ser identificados por deshidratación de Ser y Thr después de la eliminación beta, lo cual puede deberse a la baja cantidad de proteínas usadas inicialmente. Los péptidos identificados se asocian a los siguientes grupos proteicos: clatrin, RNA helicasas, DNA polimerasas, trans-sialidasas y dos a proteínas no caracterizadas.

Existen diferentes métodos para la detección de la *O*-GlcNAcilación. Una primera evidencia, es la presencia de UDP-GlcNAc, el sustrato de esta MPT; este glico nucleótido es relativamente abundante en *T. cruzi* y es producto de la ruta de síntesis de las hexosaminas, como ya ha sido reportado (Turnock & Ferguson, 2007). Otra forma de evidenciar la *O*-GlcNAcilación es por la presencia de las secuencias que codifican las enzimas OGT y OGA; en *T. cruzi*, no se han encontrado estas secuencias, posiblemente a que su genoma no ha sido totalmente curado y la gran cantidad de proteínas con funciones desconocidas del parásito. En el protista, *P. falciparum*, sucede algo similar, ya que se han encontrado proteínas modificadas pero las enzimas no han podido ser caracterizadas (Kupferschmid et al., 2017). En bacterias como *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus pneumoniae* se han caracterizado

enzimas OGT cuya función es esencial para la motilidad y adhesión; sin embargo, sus secuencias no son homólogas a la enzima caracterizada en animales (Shen, Kamp, Gründling, & Higgins, 2006; Shi et al., 2014).

El presente trabajo, se enfocó en la detección de la *O*-GlcNAcilación por técnicas proteómicas, que incluyen: reconocimiento por anticuerpos monoclonales como RL2 y CTD 110.6, los cuales han sido probados en variedad de tejidos y células, incluyendo organismos protistas (Kupferschmid et al., 2017; Perez-Cervera et al., 2011). Estos anticuerpos, permitieron visualizar el patrón de componentes proteicos *O*-GlcNAcilados en epimastigotes de *T. cruzi* por western blot e inmunofluorescencia. A pesar de que *T. cruzi* presenta tres estadios morfológicos principales, en este trabajo, se eligió emplear epimastigotes, cuya reproducción es extracelular, lo cual permite prevenir la contaminación de los extractos con proteínas de origen animal. Como se observa en la figura 5, el proteoma de *T. cruzi*, es rico en proteínas *O*-GlcNAciladas, con un amplio rango de pesos moleculares, como se había descrito previamente para *T. gondii* y *P. falciparum*.

El anticuerpo monoclonal RL2, fue desarrollado específicamente para detectar residuos *O*-GlcNAcilados de proteínas del complejo de poro nuclear (Holt et al., 1987); sin embargo, es capaz de detectar otras proteínas *O*-GlcNAciladas. CTD110.6 es un anticuerpo IgM dirigido contra la altamente *O*-GlcNAcilada región C terminal de la RNA polimerasa II, presentando una reactividad mas amplia que RL2. Estos dos anticuerpos no reconocen los mismos epítomos por lo que los patrones observados en el western blot no pueden corresponder completamente (Okuda, 2017). El western blot con el anticuerpo RL2, también permitió revelar que la alfa tubulina inmuno-precipitada de epimastigotes de *T. cruzi* se encuentra *O*-GlcNAcilada, lo que coincide con lo reportado para *P. falciparum* y *T. gondii* (Aquino-Gil et al., 2018; Kupferschmid et al., 2017). Adicionalmente, el mismo anticuerpo RL2 en

inmunofluorescencia, permitió visualizar la *O*-GlcNAcilación en los epimastigotes completos.

La primer descripción de la *O*-GlcNAcilación, se realizó por medio de la enzima GalT bovina, que adiciona residuos Gal a los *O*-GlcNAc terminales (Torres & Hart, 1984); desde entonces esta técnica ha sido mejorada con la de click chemistry que actualmente permite el uso de una GalT modificada (GalT1 Y289L) que transfiere GalNAz a los residuos -GlcNAcilados y puede ser detectada por la adición selectiva de biotina-alquilada. Esta técnica nos permitió corroborar la presencia de proteínas *O*-GlcNAciladas en *Trypanosoma cruzi*.

La *O*-GlcNAcilación, es una modificación post traduccional que se caracteriza por ser dinámica y ocurrir en respuesta a estímulos en el medio. En este trabajo, se expuso a los epimastigotes de *T. cruzi* a medios con diferentes cantidades de glucosa disponible, este nutriente es requerido para la producción de UDP-GlcNAc y adicionalmente, su ausencia en el intestino posterior del insecto vector se considera uno de los factores desencadenantes de la metaciclogenia. El estrés térmico es otra condición ambiental a la cual se enfrenta *T. cruzi* al infectar a los mamíferos, y en la cual se ha reportado variación en la expresión proteica (Pérez-Morales et al., 2012). La *O*-GlcNAcilación esta presente en el parasito en las diferentes condiciones ambientales a las que fue expuesto, como se puede observar en la inmunofluorescencia con el anticuerpo RL2 (Figura 9); sin embargo, en western blot, se detecta una mayor intensidad en los componentes con pesos entre 42 y 60 kDa en los tratamientos con menor cantidad de glucosa disponible (0- 55mM) como se observa en la figura 8A y en el componente de 70 kDa en los epimastigotes en estrés térmico (Figura 8B), el cual es posible que corresponda a una de las proteínas de choque térmico previamente reportadas (Urményi, Silva, & Rondinelli, 2014), lo cual nos sugiere que la *O*-GlcNacilación puede estar implicada en la respuesta homeostática de *T. cruzi*.

Una vez comprobada la presencia de la *O*-GlcNAcilación en *T. cruzi*, el siguiente paso consistió en identificar las proteínas modificadas.

En mamíferos, se han identificado miles de proteínas *O*-GlcNAciladas con funciones diversas; sin embargo, muy pocas se han descrito en protistas, destacando la HSP 70 y tubulina que fueron identificadas en *T. gondii* por inmunoprecipitación (Perez-Cervera et al., 2011) y también fueron dos de las trece proteínas identificadas en *P. falciparum* empleando una combinación de técnicas de enriquecimiento por afinidad con WGA y por click chemistry, electroforesis y espectrometría de masas de los componentes reconocidos (Kupferschmid et al., 2017). Un acercamiento similar, permitió la identificación de 357 proteínas *O*-GlcNAciladas en *T. gondii*, incluyendo rhoptrias, que están implicadas en el proceso de infección (Aquino-Gil et al., 2018). En diversas publicaciones se ha reportado una mayor eficiencia de las técnicas de click chemistry para la identificación de proteínas *O*-GlcNAciladas (Deracinois et al., 2018; Hahne et al., 2013; Kupferschmid et al., 2017; Ostrowski, Gundogdu, Ferenbach, Lebedev, & van Aalten, 2015), por lo cual, en este trabajo, se combinaron el marcaje y enriquecimiento de proteínas *O*-GlcNAciladas en resina por click chemistry, seguida de proteólisis y espectrometría de masas. Esta combinación de técnicas permitió identificar 1271 proteínas. Se ha reportado la posible interferencia de residuos GlcNAc no reductores en el proceso de enriquecimiento; en un trabajo similar, el 1% de las proteínas presentó unión inespecífica (Hahne et al., 2013), por lo cual en este trabajo, se decidió establecer un punto de corte adicional con base en el área MS, como se describe en la metodología. Las proteínas identificadas se relacionan con variedad de funciones biológicas, incluyendo síntesis de ácidos nucleicos, transcripción, síntesis de proteínas, constituyentes de citoesqueleto, mitocondriales, respuesta al estrés, peptídicas e incluso

retrotransposones, que son proteínas exclusivas de kinetoplastidos cuya función es aun desconocida.

Las mucinas son las glico-proteínas de superficie mas abundantes en *T. cruzi*, las cuales pueden ser modificadas por grandes cadenas de glicanos por una unión α -GlcNAc-o-Thr. Incluso, en algunas cepas, es posible encontrar una pequeña cantidad de GlcNAc no sustituido (Salto, Gallo-Rodriguez, Lima, & de Lederkremer, 2000). Diversas proteínas de superficie, lisosomales y de secreción como las transialidasas, mucinas y algunas proteasas son modificadas por la adición de β -GlcNAc a los residuos aspargina (Asn), seguidos de un complejo entramado de manosas; sin embargo se puede llegar a presentar como un glicano simple (GlcNAc-Asn) (Maria Julia Manso Alves et al., 2017), por lo que la identificación de proteínas extracelulares que no se espera estén modificadas por la *O*-GlcNAcilación, era una posibilidad. Solamente cuatro de las 1271 proteínas *O*-GlcNAciladas putativas han sido clasificadas como extracelulares; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que algunas de éstas puedan no estar *O*-GlcNAciladas.

Gran cantidad de proteínas identificadas, ya han sido descritas como *O*-GlcNAciladas en otros modelos, lo cual refuerza la universalidad de la *O*-GlcNAcilación. Las 10 proteínas *O*-GlcNAciladas se enlistan en la Figura 11. La tubulina, se encuentra abundantemente representada entre la proteínas *O*-GlcNAciladas descritas en protistas, en el presente trabajo se identificó en epimastigotes de *T. cruzi* por inmunoprecipitación (Figura 5C). Los microtúbulos de *T. cruzi*, son estructuras constitutivas del citoesqueleto, compuestas por dos alfa-tubulinas y una beta-tubulina, las cuales se encuentran en el flagelo y bajo la membrana plasmática como microtúbulos subpeliculares; sus funciones van desde la motilidad, morfología celular, transporte intracelular y división celular. Las isoformas de tubulina

también han sido estudiadas como blancos de sustancias con actividad anti-Chagásica (Sueth-Santiago, Decote-Ricardo, Morrot, Freire-de-Lima, & Lima, 2017) y como candidatos para el desarrollo de vacunas (Montalvão et al., 2018). Conociendo el papel de la *O*-GlcNAcilación en la regulación de la formación de microtúbulos (Ji et al., 2011), nuestros resultados, sugieren la posibilidad de influir en la polimerización de microtúbulos de *T. cruzi*, interfiriendo en la *O*-GlcNAcilación de las tubulinas.

La detección de seis péptidos blanco de la *O*-GlcNAc nos proporciona posibles blancos para el estudio de la *O*-GlcNAcilación en *T. cruzi*: las Trans-sialidasas son un grupo de proteínas involucradas en la patogénesis, las clatrininas, son mediadoras de la endocitosis en la bolsa flagelar y el complejo de citostoma, las helicasas y polimerasas de ADN están implicadas en los procesos de replicación y transcripción e incluso en la reparación de material genético por daño oxidativo. No nos es posible predecir el significado de estos motivos específicos de *O*-GlcNAcilación; sin embargo, su reconocimiento refuerza la necesidad de estudiar las funciones de la *O*-GlcNAcilación en proteínas y procesos celulares específicos de *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

En este trabajo, por primera vez, se demostró la presencia de *O*-GlcNAcilación en el protista *Trypanosoma cruzi* y se identificó una amplia variedad de proteínas *O*-GlcNAciladas putativas, así como seis sitios de modificación. La evidencia experimental, sugiere la implicación de esta modificación post traduccional en los mecanismos de homeostasis del parásito, abriendo un nuevo campo de investigación para el estudio de sus mecanismos de adaptación, supervivencia e invasión, así como en la búsqueda de blancos de tratamiento.

LITERATURA CITADA:

- Alves, Maria Júlia M, & Colli, W. (2008). Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Sub-Cellular Biochemistry*, 47, 58–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512341>
- Alves, Maria Julia Manso, Kawahara, R., Viner, R., Colli, W., Mattos, E. C., Thaysen-Andersen, M., ... Palmisano, G. (2017). Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Proteomics*, 151, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.034>
- Aquino-Gil, M. O., Kupferschmid, M., Shams-Eldin, H., Schmidt, J., Yamakawa, N., Mortuaire, M., ... Lefebvre, T. (2018). Apart From Rhoptries, Identification of *Toxoplasma gondii*'s O-GlcNAcylated Proteins Reinforces the Universality of the O-GlcNAcome. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 450. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00450>
- Ash, C., & Jasny, B. R. (2005, July 15). Trypanosomatid genomes. *Science*, 309(5733), 399–400. <https://doi.org/10.1126/science.309.5733.399>
- Atwood, J A, Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., ... Tarleton, R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1110289>
- Atwood, James A., Minning, T., Ludolf, F., Nuccio, A., Weatherly, D. B., Alvarez-Manilla, G., ... Orlando, R. (2006). Glycoproteomics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope labeling. *Journal of Proteome Research*, 5(12), 3376–3384. <https://doi.org/10.1021/pr060364b>
- Banerjee, S., Robbins, P. W., & Samuelson, J. (2009). Molecular characterization of nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology*, 19(4), 331–336. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn107>
- Baudoin, L., & Issad, T. (2014). O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 235. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00235>
- Bayona, J. C., Nakayasu, E. S., Laverrière, M., Aguilar, C., Sobreira, T. J. P., Choi, H., ... Alvarez, V. E. (2011). SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 10(12), M110.007369. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.007369>
- Bond, M. R., & Hanover, J. A. (2015). A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of Cell Biology*, 208(7), 869–880. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501101>
- Burleigh, B. A., & Woolsey, A. M. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology*, 4(11), 701–711. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00226.x>
- Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2015). Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Frontiers in Immunology*, 6, 659. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>
- Clayton, C., & Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.007>

- Deracinois, B., Camoin, L., Lambert, M., Boyer, J.-B., Dupont, E., Bastide, B., & Cieniewski-Bernard, C. (2018). O-GlcNAcylation site mapping by (azide-alkyne) click chemistry and mass spectrometry following intensive fractionation of skeletal muscle cells proteins. *Journal of Proteomics*, *186*, 83–97. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2018.07.005>
- Dieckmann-Schuppert, A., Bause, E., & Schwarz, R. T. (1993). Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *European Journal of Biochemistry*, *216*(3), 779–788. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404896>
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., ... Andersson, B. (2005). The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of chagas disease. *Science*, *309*(5733). <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Escobar-Ramirez, A. (2008). *Inmunolocalización de las subunidades COX2A y COX2B de la citocromo C oxidasa de Toxoplasma gondii*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Groves, J. A., Lee, A., Yildirim, G., & Zachara, N. E. (2013). Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress & Chaperones*, *18*(5), 535–558. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0426-y>
- Gupta, I., Aggarwal, S., Singh, K., Yadav, A., & Khan, S. (2018). Ubiquitin Proteasome pathway proteins as potential drug targets in parasite Trypanosoma cruzi. *Scientific Reports*, *8*(1), 8399. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26532-z>
- Hahne, H., Sobotzki, N., Nyberg, T., Helm, D., Borodkin, V. S., van Aalten, D. M. F., ... Kuster, B. (2013). Proteome Wide Purification and Identification of O -GlcNAc-Modified Proteins Using Click Chemistry and Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, *12*(2), 927–936. <https://doi.org/10.1021/pr300967y>
- Holt, G. D., Snow, C. M., Senior, A., Haltiwanger, R. S., Gerace, L., & Hart, G. W. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of Cell Biology*, *104*(5), 1157–1164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3571327>
- Ji, S., Kang, J. G., Park, S. Y., Lee, J., Oh, Y. J., & Cho, J. W. (2011). O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids*, *40*(3), 809–818. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0698-9>
- Kupferschmid, M., Aquino-Gil, M. O., Shams-Eldin, H., Schmidt, J., Yamakawa, N., Krzewinski, F., ... Lefebvre, T. (2017). Identification of O-GlcNAcylated proteins in Plasmodium falciparum. *Malaria Journal*, *16*(1), 485. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2131-2>
- Ma, J., & Hart, G. W. (2014). O-GlcNAc profiling: From proteins to proteomes. *Clinical Proteomics*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-8>
- Marchini, F. K., de Godoy, L. M. F., Rampazzo, R. C. P., Pavoni, D. P., Probst, C. M., Gnad, F., ... Krieger, M. A. (2011). Profiling the Trypanosoma cruzi phosphoproteome. *PLoS One*, *6*(9), e25381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025381>
- Montalvão, F., Nascimento, D. O., Nunes, M. P., Koeller, C. M., Morrot, A., Lery, L. M. S., ... Freire-de-Lima, C. G. (2018). Antibody Repertoires Identify β -Tubulin as a Host Protective Parasite Antigen in Mice Infected With Trypanosoma cruzi. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00671>
- Moretti, N. S., Cestari, I., Anupama, A., Stuart, K., & Schenkman, S. (2018). Comparative

- Proteomic Analysis of Lysine Acetylation in Trypanosomes. *Journal of Proteome Research*, 17(1), 374–385. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00603>
- Nardy, A. F. F. R., Freire-de-Lima, C. G., Pérez, A. R., & Morrot, A. (2016). Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00348>
- Okuda, T. (2017). Western blot data using two distinct anti-O-GlcNAc monoclonal antibodies showing unique glycosylation status on cellular proteins under 2-deoxy-d-glucose treatment. *Data in Brief*, 10, 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.12.001>
- Oliveira, I. A., Freire-de-Lima, L., Penha, L. L., Dias, W. B., & Todeschini, A. R. (2014). *Trypanosoma cruzi* Trans-Sialidase: Structural Features and Biological Implications. *Sub-Cellular Biochemistry*, 74, 181–201. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_OMS, & OPS. (2018). *Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas*. OPS. Retrieved from <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49653>
- Ostrowski, A., Gundogdu, M., Ferenbach, A. T., Lebedev, A. A., & van Aalten, D. M. F. (2015). Evidence for a functional O-GlcNAc system in the thermophilic bacterium *Thermobaculum terrenum*. *The Journal of Biological Chemistry*, M115.689596-. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689596>
- Perez-Cervera, Y., Harichaux, G., Schmidt, J., Debierre-Grockiego, F., Dehennaut, V., Bieker, U., ... Schwarz, R. T. (2011). Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids*, 40(3), 847–856. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0702-4>
- Pérez-Morales, D., Lanz-Mendoza, H., Hurtado, G., Martínez-Espinosa, R., Espinoza, B., Pérez-Morales, D., ... Espinoza, B. (2012). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 902803. <https://doi.org/10.1155/2012/902803>
- Queiroz, R. M. L., Charneau, S., Mandacaru, S. C., Schwämmle, V., Lima, B. D., Roepstorff, P., & Ricart, C. A. O. (2014). Quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* amastigogenesis. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 13(12), 3457–3472. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040329>
- Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Salto, M. L., Gallo-Rodriguez, C., Lima, C., & de Lederkremer, R. M. (2000). Separation of Gal β 1 \rightarrow XGlcNAc and Galp β 1 \rightarrow XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the Alditols by High-pH Anion-Exchange Chromatography and Thin-Layer Chromatography: Characterization of Mucins from *Trypanosoma cruzi*. *Analytical Biochemistry*, 279(1), 79–84. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4466>
- Shen, A., Kamp, H. D., Gründling, A., & Higgins, D. E. (2006). A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes & Development*, 20(23), 3283–3295. <https://doi.org/10.1101/gad.1492606>
- Shi, W.-W., Jiang, Y.-L., Zhu, F., Yang, Y.-H., Shao, Q.-Y., Yang, H.-B., ... Zhou, C.-Z. (2014). Structure of a novel O-linked N-acetyl-D-glucosamine (O-GlcNAc) transferase, GtfA, reveals insights into the glycosylation of pneumococcal serine-rich repeat adhesins. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20898–20907.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.581934>

- Sueth-Santiago, V., Decote-Ricardo, D., Morrot, A., Freire-de-Lima, C. G., & Lima, M. E. F. (2017). Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World Journal of Biological Chemistry*, *8*(1), 57–80. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.57>
- Torres, C. R., & Hart, G. W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*, *259*(5), 3308–3317. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6421821>
- Turnock, D. C., & Ferguson, M. A. J. (2007). Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. *Eukaryotic Cell*, *6*(8), 1450–1463. <https://doi.org/10.1128/EC.00175-07>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2000). Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *46*(4), 269–278. [https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200008\)46:4<269::AID-CM4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200008)46:4<269::AID-CM4>3.0.CO;2-V)
- Urményi, T. P., Silva, R., & Rondinelli, E. (2014). The heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Sub-Cellular Biochemistry*, *74*, 119–135. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_5
- Vaidyanathan, K., Durning, S., & Wells, L. (2014). Functional O-GlcNAc modifications: Implications in molecular regulation and pathophysiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.884535>
- Vercoutter-Edouart, A.-S., Yazidi-Belkoura, I. El, Guinez, C., Baldini, S., Leturcq, M., Mortuaire, M., ... Lefebvre, T. (2015). Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. *Proteomics*, *15*(5–6), 1039–1050. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400326>
- Walker, J. M. (1994). The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In *Basic Protein and Peptide Protocols* (Vol. 32, pp. 5–8). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:5>
- WHO. (2010). *Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010*. Retrieved from https://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1
- WHO. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, *6*(90), 33–44. Retrieved from <http://www.who.int/wer>
- Zachara, N. E., Vosseller, K., & Hart, G. W. (2011). Detection and analysis of proteins modified by O-Linked N-Acetylglucosamine. *Current Protocols in Protein Science*, *1*(SUPPL.66). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1208s66>
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., ... Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(7), 1051–1054. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>

APENDICE

Artículo requisite para la obtención del grado:

Identification of *O*-GlcNAcylated proteins in *Trypanosoma cruzi*

Publicado en:

Frontiers in Endocrinology

29 March 2019 | <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00199>



Identification of O-GlcNacylated Proteins in *Trypanosoma cruzi*

Elia Torres-Gutiérrez¹, Yobana Pérez-Cervera², Luc Camoin³, Edgar Zenteno¹, Moyira Osny Aquino-Gil^{2,4,5}, Tony Lefebvre⁵, Margarita Cabrera-Bravo¹, Olivia Reynoso-Ducoing¹, Martha Irene Bucio-Torres^{1*} and Paz María Salazar-Schettino^{1*}

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, ² Centro de Investigación Facultad de Medicina-UNAM and Facultad de Odontología, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico, ³ INSERM, Institut Paoli-Calmetes, CRCM, Marseille Protéomique, Aix-Marseille Univ, Marseille, France, ⁴ Instituto Tecnológico de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca, Mexico, ⁵ CNRS, UMR 8576, UGSF, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Isam Khalaila,
Ben-Gurion University of the Negev,
Israel

Reviewed by:

Chad Slawson,
University of Kansas Medical Center
Research Institute, United States
Hai-Bin Ruan,
University of Minnesota, United States
Natasha Zachara,
Johns Hopkins University,
United States

*Correspondence:

Martha Irene Bucio-Torres
marbu@unam.mx
Paz María Salazar-Schettino
pazmar@unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 12 October 2018

Accepted: 11 March 2019

Published: 29 March 2019

Citation:

Torres-Gutiérrez E, Pérez-Cervera Y, Camoin L, Zenteno E, Aquino-Gil MO, Lefebvre T, Cabrera-Bravo M, Reynoso-Ducoing O, Bucio-Torres MI and Salazar-Schettino PM (2019) Identification of O-GlcNacylated Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Front. Endocrinol.* 10:199. doi: 10.3389/fendo.2019.00199

Originally an anthrozoosis in the Americas, Chagas disease has spread from its previous borders through migration. It is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Differences in disease severity have been attributed to a natural pleomorphism in *T. cruzi*. Several post-translational modifications (PTMs) have been studied in *T. cruzi*, but to date no work has focused on O-GlcNAcylation, a highly conserved monosaccharide-PTM of serine and threonine residues mainly found in nucleus, cytoplasm, and mitochondrion proteins. O-GlcNAcylation is thought to regulate protein function analogously to protein phosphorylation; indeed, crosstalk between both PTMs allows the cell to regulate its functions in response to nutrient levels and stress. Herein, we demonstrate O-GlcNAcylation in *T. cruzi* epimastigotes by three methods: by using specific antibodies against the modification in lysates and whole parasites, by click chemistry labeling, and by proteomics. In total, 1,271 putative O-GlcNAcyated proteins and six modification sequences were identified by mass spectrometry (data available via ProteomeXchange, ID PXD010285). Most of these proteins have structural and metabolic functions that are essential for parasite survival and evolution. Furthermore, O-GlcNAcylation pattern variations were observed by antibody detection under glucose deprivation and heat stress conditions, supporting their possible role in the adaptive response. Given the numerous biological processes in which O-GlcNAcyated proteins participate, its identification in *T. cruzi* proteins opens a new research field in the biology of Trypanosomatids, improve our understanding of infection processes and may allow us to identify new therapeutic targets.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, O-GlcNAcyated proteins, post translational modification, epimastigote, protist, click chemistry, mass spectrometry

INTRODUCTION

The protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease (CD). Also called American trypanosomiasis, CD is one of the biggest public health problems in Latin America. CD has spread to other continents due to increased population movements to and from Latin America. An estimated 8 million people are infected with the parasite worldwide (1). In 1909, the Brazilian physician Carlos Chagas described the disease in its acute and chronic phases. Most

chronic-phase CD patients are symptom-free, but some may progress to cardiac, digestive, and/or neurological forms of the disease, which can be life-threatening when left untreated. The current treatment of CD is based on nifurtimox and benznidazole; developed in the 1960s and early 1970s. Both drugs have limitations, including a variable efficacy, long treatment courses, and toxicity. With only two drugs available for treatment, it is crucial to search for alternative targets for anti-CD therapies (2, 3). To this end, further information about basic regulatory functions in the parasite life cycle is much needed.

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite with a complex life cycle that requires one mammal and one arthropod host and involves three developmental stages. These changes allow the parasite to face environmental conditions such as variable temperatures and nutrient availability (4–6). The mechanisms that allow parasites to sense environmental changes and trigger a response are vital for their survival and establishment in a host (6, 7). The adaptive response requires modulating protein expression profiles, which are mainly regulated by post-transcriptional and post-translational modifications (PTMs) (8). Several PTMs have been reported in *T. cruzi*, including glycosylation of membrane proteins (9), acetylation of tubulins, and histone (10, 11), ubiquitination (12), SUMOylation (13), and phosphorylation of hundreds of proteins involved in several biological processes (14). Nevertheless, O-GlcNAcylation has not been reported yet in *T. cruzi* nor any Kinetoplastid protist.

O-GlcNAcylation is a dynamic PTM of proteins from the nucleus, cytoplasm, and mitochondria; it is involved in many different cell fundamental processes. Addition and removal of O-GlcNAc to/from proteins in animals is mediated by the enzymes O-GlcNAc transferase (OGT), and O-GlcNAcase (OGA) (15). UDP-GlcNAc, the donor substrate of OGT, is the final product of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP). O-GlcNAcylation is thought to regulate protein functions in an analogous manner to protein phosphorylation. The crosstalk of both PTMs allows the regulation of cellular functions in response to nutrient levels and stress (16).

Protein O-GlcNAcylation has been reported in multicellular organisms and in some prokaryotic cells, but their presence in protists is a rather neglected field. Banerjee et al. reported homolog genes for the O-GlcNAc cycling enzymes in *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* (17), and Perez Cervera et al. demonstrated the presence of O-GlcNAc-modified proteins in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by Western blot with the specific anti-O-GlcNAc RL2 and CTD 110.6 antibodies. Some O-GlcNAcylated proteins have been identified in these parasites, thirteen from *P. falciparum*, including actin, myosin, and the heat-shock protein HSP70. O-GlcNAcylated HSP70 was also identified by immunoprecipitation in *T. gondii*, and recently, proteomic analyses based on s-WGA enrichment and click chemistry revealed 357 O-GlcNAcylated proteins with several functions, including rhoptries, that are necessary for invasion (18–20).

This work is aimed to demonstrate the presence and to visualize O-GlcNAc-modified proteins in *T. cruzi* epimastigotes, and to evaluate the influence of some environmental conditions on O-GlcNAcylation patterns by Western blot,

immunofluorescence, and enzymatic labeling. The enrichment of O-GlcNAc proteins was improved by a click chemistry-based strategy using an alkyne resin. Then, 1,271 putative O-GlcNAcylated proteins and six modification sites were identified by MS/MS.

MATERIALS AND METHODS

Culture of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes

Trypanosoma cruzi epimastigotes were cultured at 28°C in RPMI 1,640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cultures were maintained in the growth phase.

Heat stress: *T. cruzi* epimastigotes were cultured in 25-cm² dishes, in 10 mL of RPMI 1,640 medium either at 28 or 37°C, at a concentration of 10⁶ cells/mL. After 4 days of incubation, cultured cells were harvested by centrifugation at 2,500 × g for 20 min at 4°C and washed three times with PBS.

Glucose availability: Culture dishes with 10 mL of RPMI 1,640 medium supplemented with various glucose concentrations (17, 11.5, 5.5, and 0 mM) were inoculated with 10⁶ parasites/mL and incubated for 5 days. Then, the cells were harvested by centrifugation at 2,500 × g for 20 min at 4°C and washed three times with PBS.

Protein Extraction

Control and experimental parasite cultures were lysed in the following homogenization buffer: 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, protease inhibitor, pH 7.4. After centrifugation at 20,000 × g for 10 min, supernatants were recovered and frozen until used.

SDS-PAGE and Western Blotting

Proteins were run on 12% SDS-PAGE under reducing conditions. Gels were either stained with Coomassie blue or electroblotted onto a PVDF sheet. Blots were saturated with 5% (w/v) blotting-grade blocker (Bio-Rad) in TBS (Tris-buffered saline)-Tween [15 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.5% (v/v) Tween] for 30 min. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Mouse monoclonal anti-O-GlcNAc RL2 (ab2739) was used at a 1:1,000 dilution; mouse polyclonal anti-O-GlcNAc CTD 110.6 and anti-alpha tubulin DM1A (Sigma, St Louis Missouri, USA) antibodies were also used. The specificity of the RL2 antibodies was checked by co-incubation with 1 M free O-GlcNAc. Then, the membranes were washed three times for 10 min with TBS-Tween and incubated with anti-mouse IgG or IgM, HRP labeled secondary antibodies (Abcam, Cambridge, UK) at a 1:5,000 dilution. The membranes were washed three times for 10 min with TBS-Tween, and spots were detected by enhanced chemiluminescence with Hyperfilms (GE Healthcare, Chicago, USA). Three independent experiments were performed and images were captured using a Bio Rad Gel Doc imaging system and processed with Quantity One software. One representative blot is shown.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation protocol was carried on using magnetic beads (Bio-Rad California, USA). Ten microgram of anti-tubulin DM1A antibody (Sigma) diluted on 200 L of PBS-Tween 0.1% were incubated on Protein C magnetic beads for 10 min at room temperature, then magnetized and supernatant were discarded. After three washes, lysed epimastigotes were added and incubated 1 h. Then three washes were realized and beads transferred to a new tube. Finally, 40 μ l of 1x reduced Laemmli Sample Buffer were added and incubated for 10 min at 70°C. SDS PAGE was performed and Wb using anti-O-GlcNAc RL2 as primary antibody, HRP conjugated anti-mouse as secondary antibody and revealed using HRP color development reagent (Bio-Rad).

Immunofluorescence Microscopy

For immunolabeling, purified *T. cruzi* epimastigotes were fixed in 4% (m/v) paraformaldehyde in PBS for 1 h at room temperature and washed with PBS. Parasite cells were permeabilized with 0.1% Tween 20 for 90 min. Non-specific sites were blocked with 1% BSA. Anti O-GlcNAc antibodies RL2 diluted 1:50 (in PBS) were added and incubated overnight. After three washes with PBS, the parasites were incubated with anti-mouse FITC antibodies (1:100 in PBS) and then fixed on glass slides with Fluoro Shield DAPI (Sigma). A Leica DM2000 microscope with a Leica DFC310 FX camera was used for visualization. The images were processed with the software Image J. One representative figure is shown of three independent experiments.

Enzymatic Labeling of O-GlcNAcylated Proteins

Click-it O-GlcNAc Enzymatic Labeling System (Invitrogen C33368) is a method for modification *in vitro* of O-GlcNAcylated proteins. Proteins were enzymatically labeled by the permissive mutant B-1,4 galactosyltransferase (Gal T1 Y289L), which transfers azido-modified galactose (GalNAz) from UDP-GalNAz to O-GlcNAc residues in the target proteins. A protein extract with no enzymatic treatment was used as a negative control, and α -crystallin, a protein with a low O-GlcNAcylation level (2–10%) was used as a positive control. Click-it O-GlcNAc enzymatic labeling was performed following the manufacturer's protocols. Labeled proteins were detected by Western blot with the Click-it Biotin Protein Analysis Detection Kit (Invitrogen C33372).

O-GlcNAcylated Proteins Labeling and Enrichment

Click-it O-GlcNAc enzymatic labeling was performed on *T. cruzi* protein extracts following the manufacturer's protocols, as described by Hahne et al. (21).

O-GlcNAcylated *T. cruzi* epimastigote proteins with azide tag were then enriched by covalent capture onto an alkyne resin through click chemistry, using the Click-it Protein Enrichment Kit (Invitrogen C10416). This technique uses the Cu(I)-catalyzed Huisgen cycloaddition to promote a cyclic addition reaction between an azide and a terminal alkyne, generating a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole as a covalent linkage. When the click reaction was complete, the beads with O-GlcNAcylated proteins

were first reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 55°C and then alkylated with 50 mM iodoacetamide (IAA) for 60 min at room temperature. The resin was subjected to an extensive washing procedure in column as follows: five washes with 1.5 mL of SDS wash buffer (100 mM Tris/HCl, pH 8; 1% SDS; 250 mM NaCl; 5 mM EDTA); five washes with 1.5 mL of urea buffer (8 M urea; 100 mM Tris/HCl, pH 8); 10 washes with 1.5 mL of 20% acetonitrile (ACN); and two washes with 1 mL of digestion buffer (100 mM TEAB, pH 8.2; 10% ACN).

Protein Digestion

Resin-bound proteins were digested overnight in 200 μ L of digestion buffer containing 1 μ g of trypsin/Lys-C mix. After digestion, the supernatant solution was discarded, and the resin was washed with 500 μ L of deionized water. Both solutions, one containing non-retained peptides and the other containing O-GlcNAc proteins, were pooled and stored before desalting. The resin was then washed twice with 1.5 mL of MS-grade water, followed by two more washes with 1.5 mL of dephosphorylation buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 1 mM MnCl₂). Non-retained peptides were desalted in a C18 reversed-phase column and dried in a centrifugal vacuum system before LC-MS/MS analysis.

Beta-Elimination

To confirm O-GlcNAc sites an on-resin dephosphorylation step between the on-resin proteolytic digest and the on-resin β -elimination was added. So ideally all peptides bound to the alkyne resin should be O-GlcNAc modified. O-GlcNAcylated peptides linked to agarose beads were dephosphorylated at 37°C for 6 h in 400 μ L of dephosphorylation buffer using 800 U of λ phosphatase and 20 U of calf intestine phosphatase. After dephosphorylation, the resin was washed twice with 1.5 mL of water and the slurry volume was adjusted to 300 μ L with water before treatment with the GlycoProfile β -elimination Kit (Sigma Aldrich). The reaction mixture was incubated in an end-over-end shaker with extensive mixing at 4°C and quenched after 24 h with 1% trifluoroacetic acid (TFA). Agarose beads were discarded, and the solution containing β -eliminated peptides, corresponding to O-GlcNAcylated peptides, was desalted in C18 reversed-phase columns and dried in a centrifugal vacuum system before LC-MS/MS analysis.

Mass Spectrometry

The samples were reconstituted with 0.1% TFA in 4% ACN and analyzed by liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) using an Orbitrap Fusion Lumos Tribrid Mass Spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany) online with an Ultimate 3000RSLCnano chromatographic system (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA). The peptides were separated using a Dionex Acclaim PepMap RSLC C18 column. First, the peptides were concentrated and purified with a Dionex pre-column (C18 PepMap100, 2 cm \times 100 μ m ID, 100 Å pore size, 5 μ m particle size) in solvent A (0.1% formic acid, 2% acetonitrile). Then, the peptides were separated on a Dionex reverse-phase LC EASY-Spray C18 column (PepMap RSLC C18, 50 cm \times 75 μ m ID, 100 Å pore size, 2 μ m particle size) at

a 300 nL/min flow rate and 40°C. After column equilibration using 4% of solvent B (20% water-80% ACN-0.1% formic acid), the peptides were eluted from the analytical column by a two-step linear gradient (4–20% ACN/H₂O-0.1% formic acid for 220 min and 20–45% ACN/H₂O-0.1% formic acid for 20 min). For peptide ionization, spray voltage was set at 2.2 kV and the capillary temperature at 275°C. The mass spectrometer was used in data-dependent mode to switch consistently between MS and MS/MS. The time between master scans was set to 3 s. MS spectra were acquired in an *m/z* range of 375–1,500, with a FWHM resolution of 120 000 measured at 200 *m/z*. AGC target was set at 4.0e5 with a maximum injection time of 50 ms. The ion generated from polydimethylcyclsiloxane during the electrospray process the protonated (Si(CH₃)₂O)₆ at *m/z* 445.120025 was used as lock mass for internal mass calibration. The most abundant precursor ions were selected, and a higher-energy collisional dissociation fragmentation was performed and analyzed in the Orbitrap analyzer with a resolution of 50,000. The number of precursor ions was automatically defined along run in 3 s windows, using the Inject Ions for All Available Parallelizable Time option with a maximum injection time of 105 ms and an AGC target of 1.0e5. Charge state screening was enabled to include precursors with two and seven charge states. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of one and a duration of 60 s.

Protein Identification and Abundance Quantification

The acquired raw MS data were processed with the software Proteome Discoverer v.1.4.1.14 (Thermo Fisher Scientific). Data were searched via SEQUEST HT against the Uniprot *T. cruzi* reference proteome database (retrieved on February 14, 2018, 44 286 entries). The following parameters were used for searches: (i) trypsin; (ii) two missed cleavages were allowed; (iii) monoisotopic precursor tolerance of 10 ppm, followed by 0.6 Da for fragment ions from MS/MS; and (iv) cysteine carbamidomethylation (+57.0215) and methionine oxidation (+15.995) as variable modifications. False discovery rate (FDR) was processed using Percolator a semi-supervised machine learning to discriminate correct from incorrect peptide-spectrum matches (22), and was set to a *q*-value of 1 and 5% for, respectively, define high and low confident peptides. In addition, only peptide spectrum matches with a delta Cn Sequest HT parameters better than 0.15 were considered and proteins were identified with at least two peptides per protein. Additionally, a threshold was established based on the MS area, which meant that the proteins with the lowest intensities which conformed the summed intensity of 7×10^8 were considered potential background (21). The abundance of the different identified proteins were determined by label-free quantitative proteomics using the TOP 3 method (23, 24). Peptides from β -elimination experiments were identified as described above, except that dehydration of Ser and Thr (−18.011 a.m.u.) and β -elimination of Cys (−33.988 a.m.u.) were added as variable modifications. Mass spectrometry proteomics data were deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (25) partner repository with the dataset identifier PXD010285.

RESULTS

Trypanosoma cruzi Express O-GlcNAcylated Proteins

After the O-GlcNAc modification was first described in 1984, several approaches have been used to detect it. Antibody detection and residue enzymatic elongation by bovine GalT are commonly used. Both assays were performed herein to visualize *T. cruzi* O-GlcNAcylated proteins. A wide range of proteins, from 10 to 250 kDa, were recognized when epimastigote proteins were exposed to the broadly used anti O-GlcNAc antibodies RL2 (Figure 1A) and CTD110.6 (Figure 1B). O-GlcNAcylation was also detected in whole epimastigotes by immunofluorescence microscopy with the RL2 antibody (Figure 1D). To show evidence about the O-GlcNAcylation of a specific protein, an immunoprecipitation protocol were performed to isolate alpha tubulin, that were previously described in other protist parasites (19). The O-GlcNAcylation was revealed by western blot using RL2 as primary antibody.

To confirm the presence of O-GlcNAcylated proteins in *T. cruzi* epimastigotes, a galactose derivative (GalNAz) was bound to GlcNAc moieties by an engineered galactosyltransferase (GalT1 Y289L). This was followed by a selective and specific chemical addition of biotinalkyne to allow the detection of the tagged proteins or peptides by the avidin-peroxidase system (Figure 2A). This highly sensitive technique confirmed that the *T. cruzi* proteome is rich in O-GlcNAcylated proteins (Figure 2B).

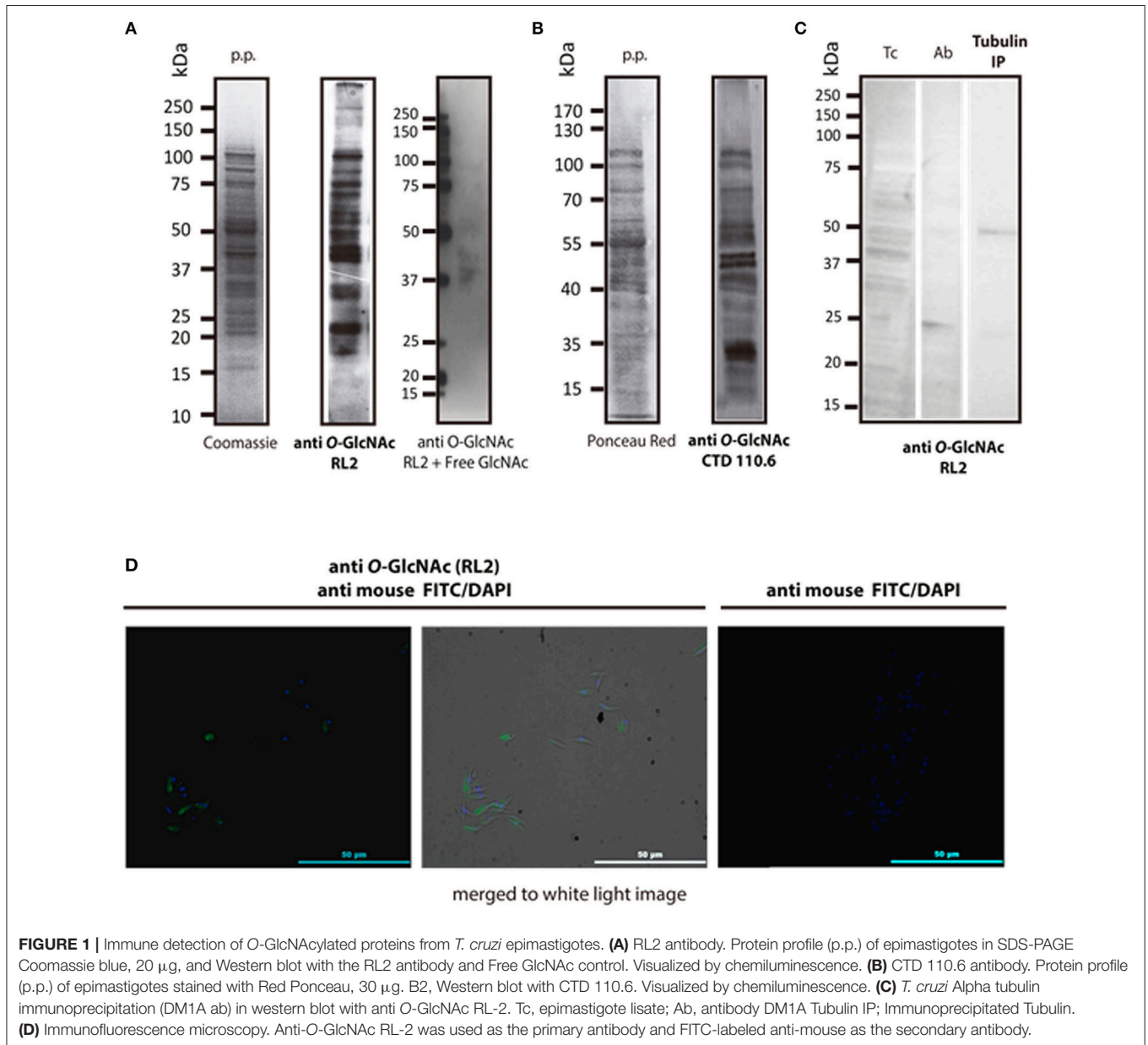
These results demonstrate for the first time the presence of O-GlcNAc modifications in *T. cruzi*. No previous reports have been published about this PTM in any Kinetoplastid parasite.

Environmental Conditions Influence Protein O-GlcNAcylation Pattern in *T. cruzi* Epimastigotes

Protein O-GlcNAcylation exhibits a great dynamism. To assess whether O-GlcNAcylation patterns vary under diverse environmental conditions, parasites were grown under different temperatures and glucose availability. While O-GlcNAcylation was detected by western blot and immunofluorescence in every condition (Figure 3C), O-GlcNAcylated protein patterns under low glucose availability (0–5.5 mM) showed a higher reaction in bands of 60, 50, and 45 kDa. The 42 kDa band show higher O-GlcNAcylation mainly on 5.5 mM glucose condition (Figure 3A). Contrasting, under heat stress (37°C) most components showed reduced O-GlcNAcylation, except for 70 kDa band, as shown in Figure 3B.

Identification of O-GlcNAcylated Proteins in *T. cruzi*

Once the presence of O-GlcNAcylated proteins in *T. cruzi* was established, their identity was studied. Several methods for protein identification have been described, including some based on lectins or antibody enrichment; in the past 10 years, click chemistry-based methods have gained prominence. The highly sensitive labeling of proteins by azide-modified

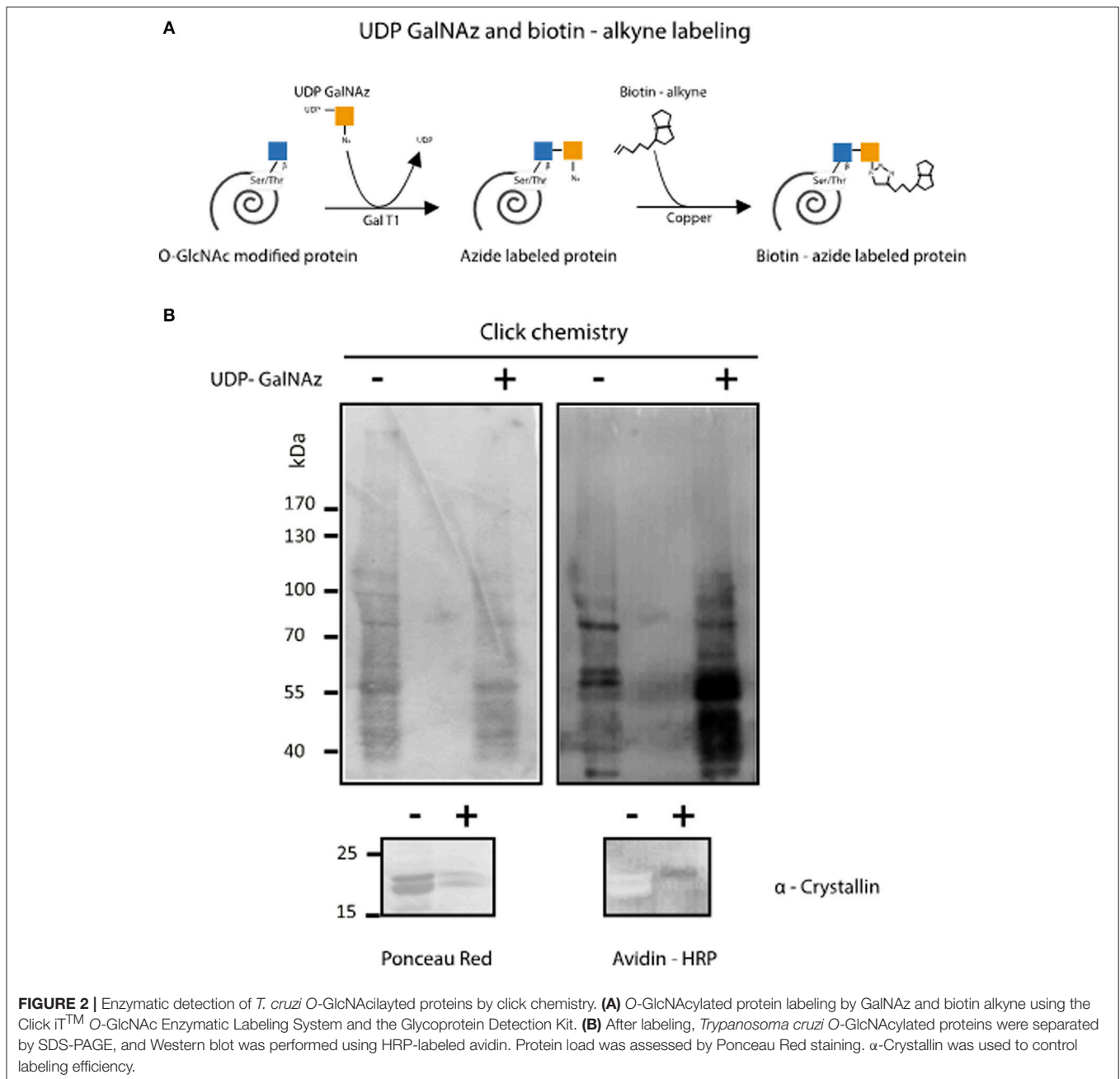


galactose and copper-mediated click chemistry was used herein, followed by purification of modified proteins on an alkyne-resin (17) (**Figure 4**). On-resin trypsin proteolysis followed by LC-MS/MS allowed the identification of 1,271 putative O-GlcNAc proteins at 5% false discovery rate (FDR) and eliminating the proteins with the lowest intensities which could be considered as potential background as mentioned in materials and methods. These proteins belong to a broad range of biological functions and participating in various cellular pathways. Of the 10 most abundant putative O-GlcNAcylated proteins, three are constitutive of the cytoskeleton, three participate in oxidation reduction processes and the others include kinases, and proteins that participate in biosynthesis and stress response. The classification by function

of the 100 most abundant based on Top3 quantification, are shown in **Figure 5**, and full data are available via ProteomeXchange, ID PXD010285 and **Supplementary Table 1**. Subsequent elution of on-resin O-GlcNAcylated peptides by β -elimination led to the identification of 6 peptides corresponding to O-GlcNAc modification sites at 5% FDR (**Supplementary Figure 1**).

DISCUSSION

Protein O-GlcNAcylation is ubiquitous in pluricellular organisms and has also been described in simple organisms, including viruses (26) and bacteria (27). Nevertheless, there are only few publications about protein O-GlcNAcylation in protist



organisms like *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* (17), *Toxoplasma gondii* (18), and *Plasmodium falciparum* (19). To date, there is no report about protein O-GlcNAcylation in *T. cruzi* or any Kinetoplastid protist. In this work, we demonstrated the presence of O-GlcNAcylated proteins in *T. cruzi* epimastigotes and determined the identity of 1,271 putative O-GlcNAcylated proteins. Surprisingly, only 6 O-GlcNAc modifications sites were identified using dehydration of Ser and Thr after beta-elimination from beads. MS-MS spectra of these peptides are given as **Supplementary Figure 1**. This low detection of modified peptides varies from our

previous similar study (28). The explanation could be associated to the lower amount of proteins initially used and to the higher number of O-GlcNAc proteins. Each O-GlcNAc modified peptide is related to one of the following protein groups: clathrins, RNA helicases, DNA polymerases, trans-sialidases and two uncharacterized proteins as seen in **Supplementary Table 2**.

Several methods have been reported to detect O-GlcNAcylation. First, the sugar nucleotide UDP-GlcNAc is known to be a substrate for this PTM. UDP-GlcNAc is relatively abundant in *T. cruzi*, being produced by conventional HBP as

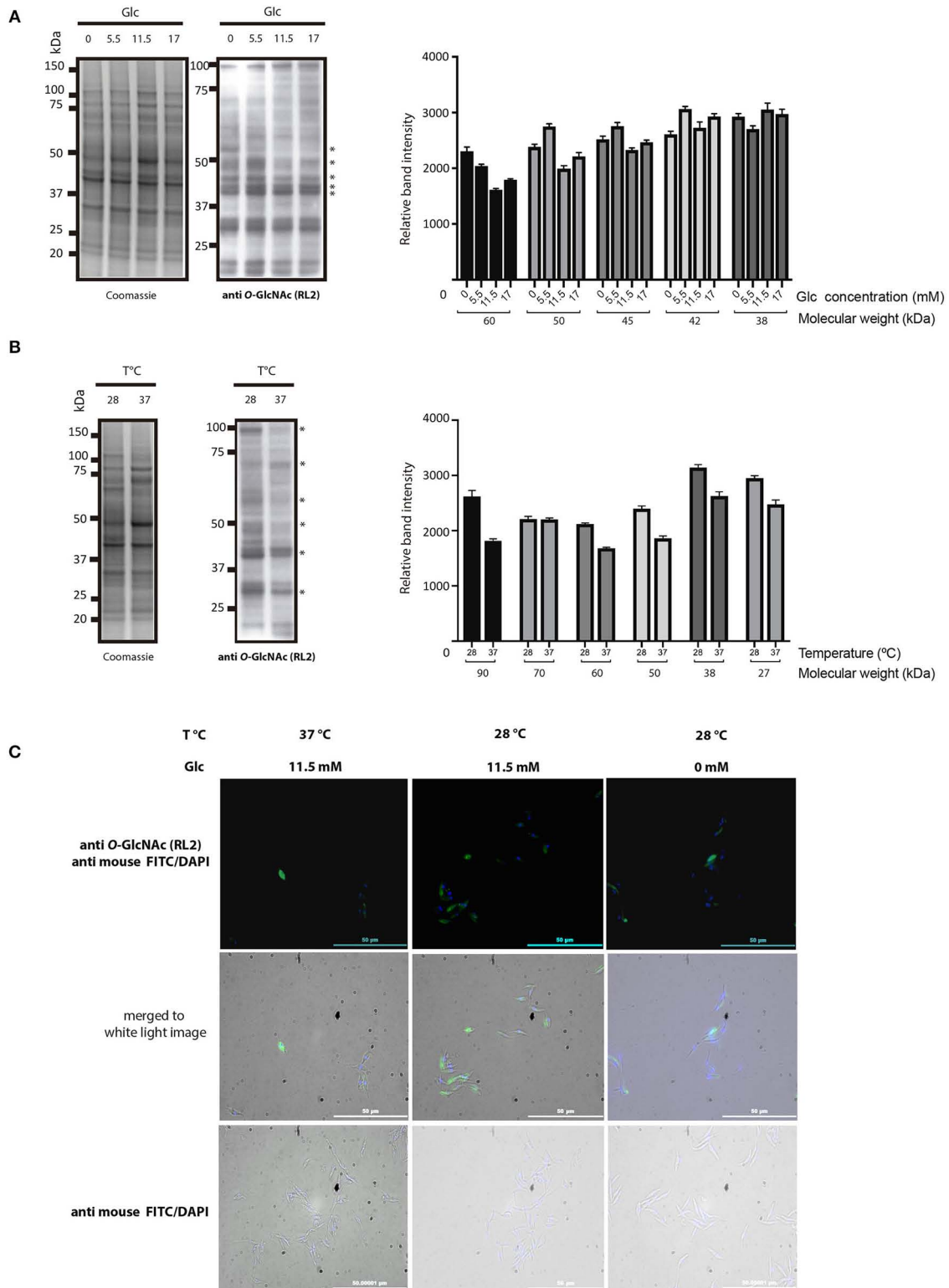
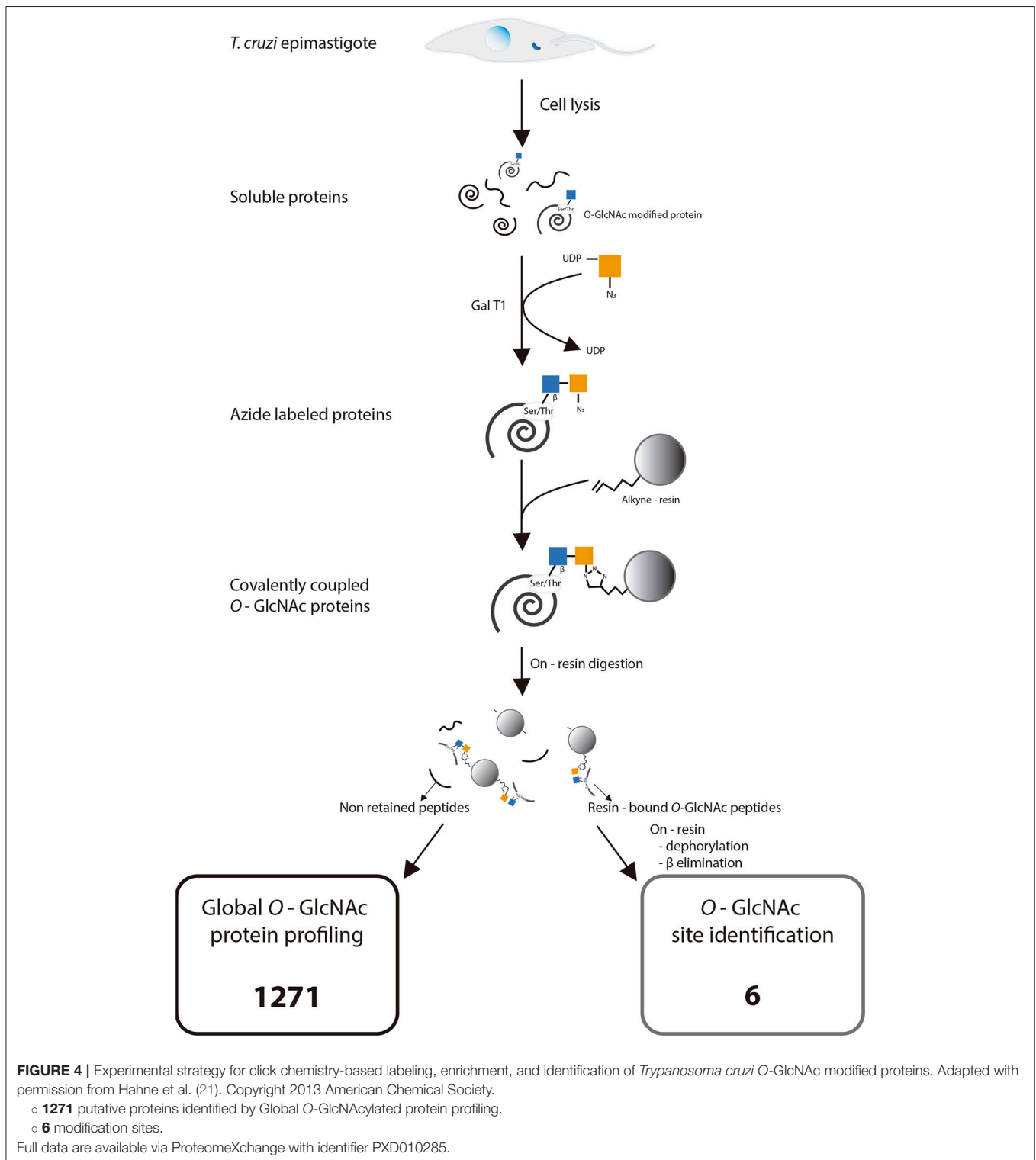
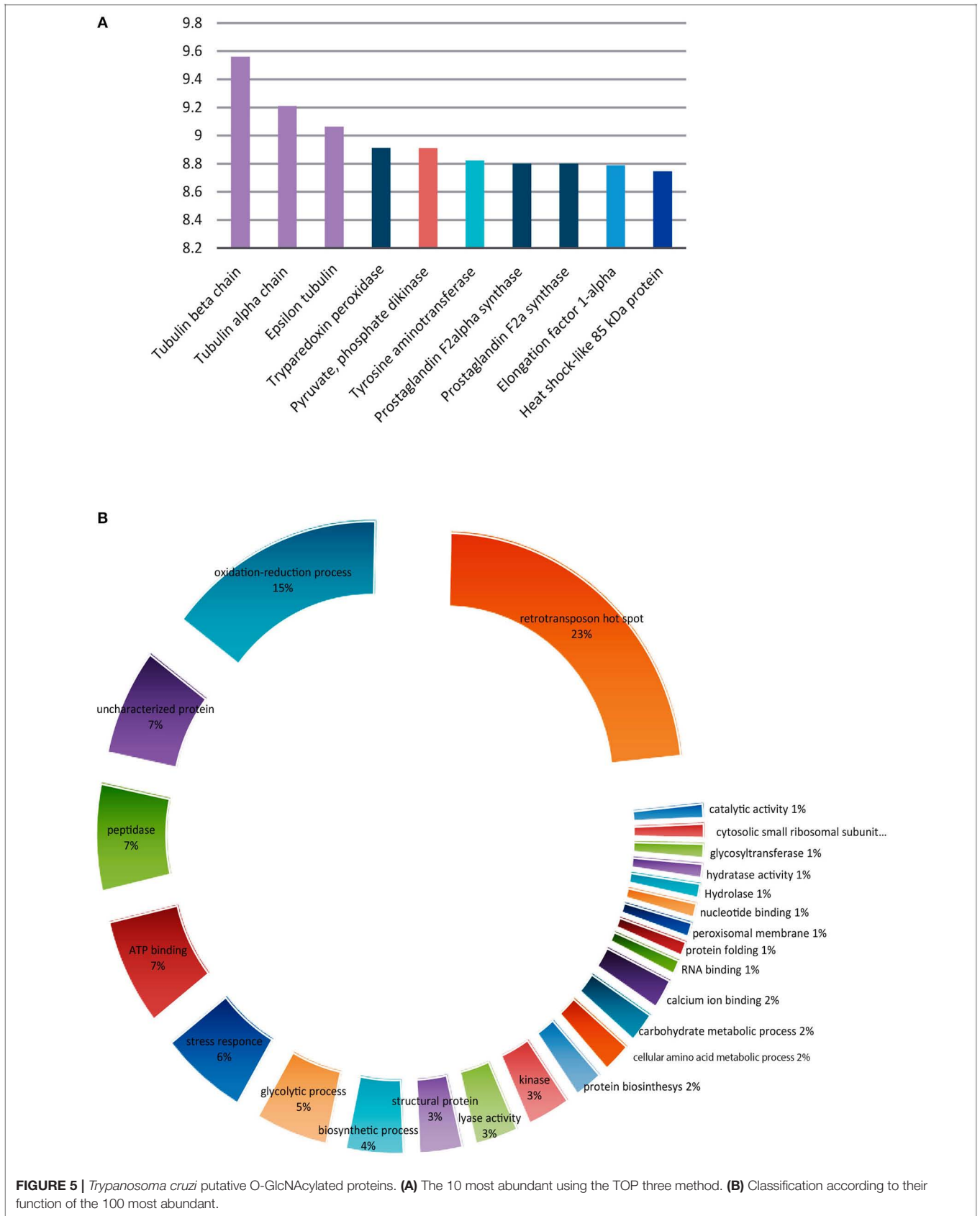


FIGURE 3 | *Trypanosoma cruzi* epimastigotes O-GlcNAcylation under various glucose availability and heat stress conditions. **(A)** O-GlcNAcylation profile under glucose availability variations. Glucose availability in culture media was 0, 5.5, 11.5, and 17 mM. Densitometry of several bands (*). **(B)** O-GlcNAcylation profile under heat stress at 37°C (28°C was the normal culture temperature). Densitometry of several bands (*). **(C)** Immunofluorescence microscopy. 28°C and Glc 11.5 mM were normal culture conditions. Heat stress at 37°C and low Glc availability (0 mM). Anti O-GlcNAc RL-2 antibody was used as the primary antibody and FITC-labeled anti mouse as the secondary antibody.



previously reported by Turnock and Ferguson (29). Second, a search for the sequences of the regulatory enzymes OGT and OGA in *T. cruzi* genome databases (for instance, by Banerje et al.) has been unfruitful, maybe due to the great number of unknown proteins in the parasite genome and

the fact that it is not completely cured. Nevertheless, some organisms have been reported as producing O-GlcNAcylated proteins, like the protist *P. falciparum*, whose OGT and OGA enzyme variants have not been characterized yet. Bacterial species like *Listeria monocytogenes* (30) and *Streptococcus*



pneumoniae (31) code for different OGT variants, which are not homologous to the animal enzymes even when they have been proved to have critical roles in functions like motility and adhesion. All OGT-detecting methods rely on antibodies or activity measurement, even though antibody detection is only acceptable when the OGT coding gene has been fully identified.

This work is focused on detecting O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches (32). Various monoclonal antibodies that recognize O-GlcNAcylated proteins are available, including the RL2, CTD 110.6, 18B10.C7, 9D1.E4, and 1F5.D6 antibodies. The most widely used and more readily available antibodies to detect O-GlcNAcylation by Western blot are RL2 (33) and CTD 110.6 (34); these antibodies can detect a variety of modified proteins in different organisms, including protist cells (18, 19). Both antibodies were used herein to visualize O-GlcNAcylated protein in *T. cruzi* epimastigotes proteome; additionally, RL2 was used for fluorescence microscopy analysis. The parasite life cycle includes three development stages, and we focused our research on epimastigotes, being the only replicative extracellular stage, so we can prevent mammal cell contamination during protein extraction. As shown in **Figure 1**, the *T. cruzi* proteome is rich in O-GlcNAcylated proteins with a wide range of molecular weights, as previously observed for *T. gondii* and *P. falciparum*. RL2 is an IgG antibody that was raised specifically against O-GlcNAc moieties of nuclear pore complex (24). However, it can also detect some other O-GlcNAc modified proteins. CTD110.6 is an IgM antibody directed against the O-GlcNAcylated C-terminal domain of RNA polymerase II proteins (34). The latter has a broader reactivity than RL2, recognizing a variety of O-GlcNAc-modified proteins. These antibodies RL2 and CTD 110.6 did not recognize the same epitopes and therefore the observed patterns were not equal, as it has been previously reported (35). Western blot using RL2, still revealed that immunoprecipitated alpha tubulin was also O-GlcNAcylated, which have been reported for *P. falciparum* and *T. gondii* (19, 20). Immunofluorescence analysis with RL2 allowed us to visualize the O-GlcNAc modification directly in the whole parasite. This first evidence of the presence of O-GlcNAcylated proteins in this parasite was further confirmed by a different approach. The O-GlcNAc modification (36) was first described by elongating O-GlcNAcylated residues with bovine GalT using UDP-[³H]-galactose; in the last 10 years, this method has evolved to include techniques from click chemistry, which use an engineered modified GalT (GalT1 Y289L) that transfers GalNAz to O-GlcNAcylated residues, followed by a selective addition of biotin alkyne. This approach demonstrated a rich pattern of protein bands in *T. cruzi* lysates (**Figure 2**), confirming the presence of this PTM in *T. cruzi*.

Since O-GlcNAcylation is characterized by a dynamic response to medium stimuli, we exposed parasites to different amounts of glucose, a nutrient required for UDP-GlcNAc production, also considering that nutrient deprivation triggers metacyclogenesis in the hindgut of the insect host. Heat stress is another environmental condition that *T. cruzi*

faces during mammal infection. O-GlcNAcylation patterns as observed by immunofluorescence showed no significant variations (**Figure 3C**); in contrast, the level of reaction observed in 60–42 kDa components by Western blot was higher in protein extracts from the low-glucose group (0–5.5 mM) (**Figure 3A**) and in 70-kDa band in the group under heat stress (**Figure 3B**), which could correspond to one of the previously reported parasite heat-shock protein (HSP) (7) and suggest a possible role of O-GlcNAcylation in the cellular homeostatic response in *T. cruzi*.

Once the presence of O-GlcNAcylated proteins in *T. cruzi* was established, we focused on identifying them. Thousands of O-GlcNAcylated proteins have been reported in mammal cells; however, only few O-GlcNAcylated proteins have been identified in protist organisms; HSP70 and tubulin were confirmed in *T. gondii* by immunoprecipitation (18). The same proteins were identified in *P. falciparum* by a combination of click chemistry enrichment and specific HSP70 and tubulin immune detection. In the same work, WGA- and click chemistry-enriched extracts were resolved by SDS-PAGE; the bands were excised and analyzed by mass spectrometry, identifying 13 proteins that participate in cell functions like glycolysis and cytoskeleton organization, or as chaperones (19). A similar approach allowed the detection of 357 O-GlcNAcylated proteins in *T. gondii*, including rhoptries, which play a role in host infection (20). Considering the work by Kupfershmid and other authors, reporting that click chemistry-based strategies improved protein identification (21, 37, 38), we combined click chemistry-based O-GlcNAcylated protein labeling, click chemistry enrichment on alkyne resin, and on-resin trypsin proteolysis with MS/MS peptide sequencing. However, it must be noted that there is a potential interference in the enrichment procedure with non-reducing GlcNAc residues on O-linked and N-linked glycoproteins as have been reported for ovalbumin (39); when in a similar approach only 1% of the proteins were unspecifically bound, as the summed intensity of the labeled sample were 60-fold higher than the negative control (21), in the present work an additional threshold was set based on the MS area as described in the material and methods section. This combination of methods allowed us to identify 1,271 proteins displaying a wide variety of biological functions, including nucleic acid synthesis, transcription, protein synthesis, structural constitution of cytoskeleton, mitochondrial function, stress response, ATP cycling, peptidase activity and noteworthy retro-transposon hot spot (RHS) that are kinetoplastids exclusive proteins whose functions remain unveiled (data are available via ProteomeXchange, ID PXD010285 and **Supplementary Table 1**). It is well-known that the most abundant surface glycoproteins of *T. cruzi* are the mucin-like proteins, which can be modified with multiple glycan chains attached to the peptide by α -GlcNAc-O-Thr linkages (40, 41). Also when it is unusual for surface glycoproteins, in some strains, an amount of non-substituted O-linked GlcNAc has been reported (42). Many cell surface, lysosomal, and secreted proteins like trans-sialidases, mucins and some proteases, are post-translationally modified by the addition of a β -GlcNAc to the asparagine (Asn) residues, usually followed by complex branched high mannose glycans

but it could also be found as a small chitobiose glycan (GlcNAc₁₋₂Asn) (43). So, the identification of extracellular proteins that are not expected to be O-GlcNAc modified is a matter of concern. However, only four of the 1,271 putative O-GlcNAcylated proteins were considered extracellular. Nevertheless, we cannot rule out the possibility that some of the identified surface or secreted proteins might also not be O-GlcNAc modified.

Several identified proteins were previously described as O-GlcNAcylated in other models, a finding that supports the universal role of O-GlcNAcylation in cell biology. The 10 most abundant putative modified proteins are listed in **Figure 5**. As shown, tubulin is abundantly represented among protist O-GlcNAcylated proteins and we found it on *T. cruzi* epimastigotes by immunoprecipitation as can be seen on **Figure 1C**; this was expected, since *T. cruzi* microtubules are cytoskeletal structures composed of two α - and one β -tubulin isoforms and are present in the flagellum and under the plasma membrane as subpellicular microtubules, and have important functions in motility, cellular morphology, intracellular transport, and cell division. Tubulin isoforms have also been studied as a target for substances with possible antichagasic activity (44) and as vaccine antigen candidates (45). Our results suggest the possibility to influence *T. cruzi* microtubule polymerization by interfering in tubulin O-GlcNAcylation, given the known role of O-GlcNAcylation in regulating microtubule formation (46).

Notably, the detection of the 6 O-GlcNAc peptides (**Supplementary Table 2**) gave us more possible targets to study the role of the O-GlcNAc modification in *T. cruzi*. Trans-sialidases are a highly studied group of proteins of *T. cruzi* that are involved in pathogenesis (47). Clathrins expression has been previously reported on *T. cruzi* and are known to mediate endocytosis at the flagellar pocket and the cytostome complex (48). Helicases and DNA polymerases are linked to replication and transcription processes and even DNA repair of oxidative lesions (49). All these proteins play important roles in *T. cruzi* stress response, nutrition and life cycle progression as have been reported for mammal cells (50). The meaning of these specific O-GlcNAc motifs is not possible to be predicted, nevertheless, this highlights the necessity of further research to elucidate the functions of O-GlcNAcylation in specific proteins and cellular processes of *T. cruzi*.

CONCLUSIONS

This is the first demonstration of the occurrence of the O-GlcNAc modification in *T. cruzi*. We also provide a large-scale identification of putative O-GlcNAcylated proteins with several cellular functions and 6 O-GlcNAc modification sites. Experimental evidence suggests the possible role of O-GlcNAcylation in the cellular homeostatic response in *T. cruzi* and opens a totally new field to study the mechanisms of parasite adaptation, survival, and invasion, which would help us to identify new drug targets.

DATA AVAILABILITY

Mass spectrometry proteomics data were deposited and can be found in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (25) partner repository with the dataset identifier PXD010285.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ET-G, PS-S, YP-C, and EZ developed the hypotheses. ET-G performed most of the biochemical experiments and interpreted the data. MA-G and OR-D contributed performing certain experiments. LC performed the on resin digest, the mass spectrometry analysis and provided the resulting data. MB-T, MC-B, and TL provided biological material and technical support. PS-S, YP-C, and EZ initiated the project. ET-G, YP-C, TL, EZ, and PS-S analyzed the results. ET-G, PS-S, and YP-C drafted the manuscript. All authors contributed to refining the manuscript, read and approved the final version.

ACKNOWLEDGMENTS

To Karen Julissa Loaeza-Reyes, Yolanda Guevara Gomez, and Mariana De Alba Alvarado for their technical support. MA-G hold a fellowship of CONACyT from the government of Mexico. The authors thank the UNAM DGAPA-PAPIIT project IN227816 and IN216118, Red Temática de Glicociencia en Salud CONACyT, Cuerpo Académico Investigación en Salud UABJO CA-63 for their financial support. Proteomics analysis was supported by the Institut Paoli-Calmettes and the Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. Proteomic analyses were done using the mass spectrometry facility of Marseille Proteomics (marseille-proteomique.univ-amu.fr) supported by IBISA (Infrastructures Biologie Santé et Agronomie), Plateforme Technologique Aix-Marseille, the Cancéropôle PACA, the Provence-Alpes-Côte d'Azur Région, the Institut Paoli-Calmettes, and the Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD010285. This work fulfills one of the requirements for Elia Torres Gutiérrez to obtain a Ph.D. degree in Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00199/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | MS-MS spectra of the O-GlcNAcylated peptides.

Supplementary Table 1 | *T. cruzi* putative O-GlcNAcylated proteins in blue and potential background in red. Full data are available via ProteomeXchange with identifier PXD010285.

Supplementary Table 2 | *T. cruzi* O-GlcNAc peptides. Full data are available via ProteomeXchange with identifier PXD010285.

REFERENCES

- WHO/World Health Organization. *Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Fact Sheets*. Fact sheets. (2018). Available online at: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 2018 May, 15).
- Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2002) 97:3–24. doi: 10.1590/S0074-02762002000100001
- de Moraes CGV, Castro Lima AK, Terra R, dos Santos RF, Da-Silva SAG, Dutra PML. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *Biomed Res Int*. (2015) 2015:1–19. doi: 10.1155/2015/324915
- Pérez-Morales D, Lanz-Mendoza H, Hurtado G, Martínez-Espinosa R, Espinoza B, Pérez-Morales D, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock. *J Biomed Biotechnol*. (2012) 2012:902803. doi: 10.1155/2012/902803
- Tyler KM, Engman DM. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. (2000) 46:269–78. doi: 10.1002/1097-0169(200008)46:4<269::AID-CM4>3.0.CO;2-V
- Jimenez V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Res Microbiol*. (2014) 165:155–65. doi: 10.1016/j.resmic.2014.01.006
- Urményi TP, Silva R, Rondinelli E. The heat shock proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem*. (2014) 74:119–35. doi: 10.1007/978-94-007-7305-9_5
- Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. (2007) 156:93–101. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.07.007
- de Lederkremer RM, Agusti R. Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. (2009) 62:311–66. doi: 10.1016/S0065-2318(09)00007-9
- Souto-Padron T, Cunha e Silva NL, Souza W de. Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (1993) 88:517–28. doi: 10.1590/S0074-02761993000400004
- Picchi GFA, Zulkiewicz V, Krieger MA, Zanchin NT, Goldenberg S, de Godoy LMF. Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* canonical and variant histones. *J Proteome Res*. (2017) 16:1167–79. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00655
- Cardoso J, Lima CDP, Leal T, Gradia DF, Fragoso SP, Goldenberg S, et al. Analysis of proteasomal proteolysis during the *in vitro* metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*. (2011) 6:e21027.
- Bayona JC, Nakayasu ES, Laverrière M, Aguilar C, Sobreira TJP, Choi H, et al. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Proteomics*. (2011) 10:M110.007369.
- Marchini FK, de Godoy LMF, Rampazzo RCP, Pavoni DP, Probst CM, Gnad F, et al. Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PLoS ONE*. (2011) 6:e25381. doi: 10.1371/journal.pone.0025381
- Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol*. (2015) 208:869–80. doi: 10.1083/jcb.201501101
- Butkinaree C, Park K, Hart GW. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*. (2010) 1800:96–106. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.018
- Banerjee S, Robbins PW, Samuelson J. Molecular characterization of nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferases of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. *Glycobiology*. (2009) 19:331–6. doi: 10.1093/glycob/cwn107
- Perez-Cervera Y, Harichaux G, Schmidt J, Debierre-Grockiego F, Dehennaut V, Bieker U, et al. Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids*. (2011) 40:847–56. doi: 10.1007/s00726-010-0702-4
- Kupferschmid M, Aquino-Gil MO, Shams-Eldin H, Schmidt J, Yamakawa N, Krzewinski F, et al. Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. (2017) 16:485. doi: 10.1186/s12936-017-2131-2
- Aquino-Gil MO, Kupferschmid M, Shams-Eldin H, Schmidt J, Yamakawa N, Mortuaire M, et al. Apart from rhoptries, identification of toxoplasma gondii's o-glcNacetylated proteins reinforces the universality of the O-GlcNAc. *Front Endocrinol*. (2018) 9:450. doi: 10.3389/fendo.2018.00450
- Hahne H, Sobotzki N, Nyberg T, Helm D, Borodkin VS, van Aalten DMF, et al. Proteome Wide Purification and Identification of O-GlcNAc-modified proteins using click chemistry and mass spectrometry. *J Proteome Res*. (2013) 12:927–36. doi: 10.1021/pr300967y
- Brosch M, Yu L, Hubbard T, Choudhary J. Accurate and sensitive peptide identification with mascot percolator. *J Proteome Res*. (2009) 8:3176–81. doi: 10.1021/pr800982s
- Silva JC, Gorenstein MV, Li G-Z, Vissers JPC, Geromanos SJ. Absolute quantification of proteins by LCMS^E. *Mol Cell Proteomics*. (2006) 5:144–56. doi: 10.1074/mcp.M500230-MCP200
- Ahrné E, Molzahn L, Glatter T, Schmidt A. Critical assessment of proteome-wide label-free absolute abundance estimation strategies. *Proteomics*. (2013) 13:2567–78. doi: 10.1002/pmic.201300135
- Vizcaino JA, Csordas A, del-Toro N, Dienes JA, Griss J, Lavidas I, et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res*. (2016) 44:D447–56. doi: 10.1093/nar/gkv1145
- Ko Y-C, Tsai W-H, Wang P-W, Wu I-L, Lin S-Y, Chen Y-L, et al. Suppressive regulation of KSHV RTA with O-GlcNAcylation. *J Biomed Sci*. (2012) 19:12. doi: 10.1186/1423-0127-19-12
- Ostrowski A, Gundogdu M, Ferenbach AT, Lebedev AA, van Aalten DMF. Evidence for a functional O-GlcNAc system in the thermophilic bacterium *Thermobaculum terrenum*. *J Biol Chem*. (2015) 290:30291–305. doi: 10.1074/jbc.M115.689596
- Deracinois B, Camoin L, Lambert M, Boyer J-B, Dupont E, Bastide B, et al. O-GlcNAcylation site mapping by (azide-alkyne) click chemistry and mass spectrometry following intensive fractionation of skeletal muscle cells proteins. *J Proteomics*. (2018) 186:83–97. doi: 10.1016/j.jprot.2018.07.005
- Turnock DC, Ferguson MAJ. Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. *Eukaryot Cell*. (2007) 6:1450–63. doi: 10.1128/EC.00175-07
- Shen A, Kamp HD, Gründling A, Higgins DE. A bifunctional O-GlcNAc transferase governs flagellar motility through anti-repression. *Genes Dev*. (2006) 20:3283–95. doi: 10.1101/gad.1492606
- Shi W-W, Jiang Y-L, Zhu F, Yang Y-H, Shao Q-Y, Yang H-B, et al. Structure of a novel O-linked N-acetyl-D-glucosamine (O-GlcNAc) transferase, GtfA, reveals insights into the glycosylation of pneumococcal serine-rich repeat adhesins. *J Biol Chem*. (2014) 289:20898–907. doi: 10.1074/jbc.M114.581934
- Vercoutter-Edouard A-S, Yazidi-Belkoura IE, Guinez C, Baldini S, Leturcq M, Mortuaire M, et al. Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. *Proteomics*. (2015) 15:1039–50. doi: 10.1002/pmic.201400326
- Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol*. (1987) 104:1157–64. doi: 10.1083/jcb.104.5.1157
- Comer FI, Vosseller K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW. Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine. *Anal Biochem*. (2001) 293:169–77. doi: 10.1006/abio.2001.5132
- Okuda T. Western blot data using two distinct anti-O-GlcNAc monoclonal antibodies showing unique glycosylation status on cellular proteins under 2-deoxy-d-glucose treatment. *Data Br*. (2017) 10:449–53. doi: 10.1016/j.dib.2016.12.001
- Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. (1984) 259:3308–17.
- Zaro BW, Yang Y-Y, Hang HC, Pratt MR. Chemical reporters for fluorescent detection and identification of O-GlcNAc-modified proteins reveal glycosylation of the ubiquitin ligase NEDD4-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2011) 108:8146–51. doi: 10.1073/pnas.1102458108
- Alfaro JE, Gong C-X, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TRW, Purvine SO, et al. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109:7280–5. doi: 10.1073/pnas.1200425109
- Boeggeman E, Ramakrishnan B, Kilgore C, Khidekel N, Hsieh-Wilson LC, Simpson JT, et al. Direct identification of nonreducing GlcNAc residues on

- N-glycans of glycoproteins using a novel chemoenzymatic method. *Bioconjug Chem.* (2007) 18:806–14. doi: 10.1021/bc060341n
40. Previato JO, Jones C, Gonçalves LP, Wait R, Travassos LR, Mendonça-Previato L. O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 1994) 301 (Pt 1):151–9. doi: 10.1042/bj3010151
 41. Previato JO, Sola-Penna M, Agrellos OA, Jones C, Oeltmann T, Travassos LR, et al. Biosynthesis of O-N-acetylglucosamine-linked glycans in *Trypanosoma cruzi*: characterization of the novel uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-catalyzing formation of N-acetylglucosamine alpha1->O-threonine. *J Biol Chem.* (1998) 273:14982–8. doi: 10.1074/jbc.273.24.14982
 42. Salto ML, Gallo-Rodriguez C, Lima C, de Lederkremer RM. Separation of Galβ1→ XGlcNAc and Galβ1→ XGlcNAc (X = 3, 4, and 6) as the alditols by high-pH anion-exchange chromatography and thin-layer chromatography: characterization of mucins from *Trypanosoma cruzi*. *Anal Biochem.* (2000) 279:79–84. doi: 10.1006/abio.1999.4466
 43. Alves MJM, Kawahara R, Viner R, Colli W, Mattos EC, Thaysen-Andersen M, et al. Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteomics.* (2017) 151:182–92. doi: 10.1016/j.jprot.2016.05.034
 44. Sueth-Santiago V, Decote-Ricardo D, Morrot A, Freire-de-Lima CG, Lima MEF. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World J Biol Chem.* (2017) 8:57–80. doi: 10.4331/wjbc.v8.i1.57
 45. Montalvão F, Nascimento DO, Nunes MP, Koeller CM, Morrot A, Lery LMS, et al. Antibody repertoires identify β-tubulin as a host protective parasite antigen in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Front Immunol.* (2018) 9:671. doi: 10.3389/fimmu.2018.00671
 46. Ji S, Kang JG, Park SY, Lee J, Oh YJ, Cho JW. O-GlcNAcylation of tubulin inhibits its polymerization. *Amino Acids.* (2011) 40:809–18. doi: 10.1007/s00726-010-0698-9
 47. Nardy AFFR, Freire-de-Lima CG, Pérez AR, Morrot A. Role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. *Front Microbiol.* (2016) 7:348. doi: 10.3389/fmicb.2016.00348
 48. Kalb LC, Frederico YCA, Batista CM, Eger I, Fragoso SP, Soares MJ. Clathrin expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Cell Biol.* (2014) 15:23. doi: 10.1186/1471-2121-15-23
 49. Schamber-Reis BLF, Nardelli S, Régis-Silva CG, Campos PC, Cerqueira PG, Lima SA, et al. DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. *Mol Biochem Parasitol.* (2012) 183:122–31. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.02.007
 50. Liu C, Li J. O-GlcNAc: a sweetheart of the cell cycle and DNA damage response. *Front Endocrinol.* (2018) 9:415. doi: 10.3389/fendo.2018.00415

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Torres-Gutiérrez, Pérez-Cervera, Camoin, Zenteno, Aquino-Gil, Lefebvre, Cabrera-Bravo, Reynoso-Ducoing, Bucio-Torres and Salazar-Schettino. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO 1

Ejemplo de la base de datos:

Proteínas *O*-GlcNAcildadas de *T. cruzi*

La base de datos completa se encuentra disponible en ProteomeXchange con el número de identificación PXD010285

