

University of Groningen

Role of autophagy-related proteins and cellular microRNAs in chikungunya and dengue virus infection

Echavarria Consuegra, Sandra

DOI:

[10.33612/diss.108290836](https://doi.org/10.33612/diss.108290836)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Echavarria Consuegra, S. (2019). *Role of autophagy-related proteins and cellular microRNAs in chikungunya and dengue virus infection*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.108290836>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



APPENDICES

Dutch summary (Nederlandse samenvatting)
Curriculum vitae
Acknowledgements

Nederlandse samenvatting

Jaarlijks worden miljoenen mensen ziek na een beet met een besmette mug. Virussen die worden overgedragen op mensen door insecten worden ook wel arbovirussen genoemd. Dengue virus is het meest voorkomende arbovirus ter wereld. Elk jaar worden er naar schatting 390 miljoen mensen besmet met het dengue virus waarvan 96 miljoen mensen ziekteverschijnselen ontwikkelen. Een ander belangrijk virus dat door muggen wordt overgedragen op mensen is het chikungunya virus. In tegenstelling tot dengue worden de meeste mensen met een chikungunya virusinfectie ziek. De ziektebeelden zijn in beginsel erg vergelijkbaar. Beide infecties veroorzaken veelal koorts, hoofdpijn, pijnlijke spieren en gewrichten en huiduitslag. Sommige mensen ontwikkelen echter een ernstiger ziektebeeld. Dit gaat gepaard met lekkende bloedvaten/bloedingen tijdens een dengue virusinfectie en het ontwikkelen van chronische artritis in het geval van een chikungunya virusinfectie. Naar schatting 0,5 tot 1 miljoen mensen ontwikkelen ernstige dengue per jaar en 30-50% van de mensen die besmet zijn met het chikungunya virus ontwikkelen chronische artritis die weken, maanden of zelfs jaren kan aanhouden. Ondanks de hoge impact van deze infectieziekten op de volksgezondheid zijn er geen behandelingsmogelijkheden om ernstige ziekte te voorkomen. Voor de ontwikkeling van interventiemethoden die specifiek aangrijpen op het infectieproces is het belangrijk de virus-gastheer interacties die plaatsvinden tijdens een infectie goed te begrijpen. In dit proefschrift is onderzoek gedaan naar de invloed van cellulaire autofagie eiwitten en receptoren op dengue en chikungunya virusinfectie. Ook is onderzocht welke rol niet-coderende kleine RNA moleculen (miRNAs) spelen tijdens dengue virusinfectie.

In **Hoofdstuk 1** is een inleiding gegeven op het proefschrift. Het hoofdstuk sluit af met een beschrijving van de strekking van het proefschrift.

Hoofdstuk 2 beschrijft de literatuur aangaande de rol van autofagie tijdens infectie met de arbovirussen: dengue virus, West-Nile virus, Zika virus en het chikungunya virus. Het hoofdstuk begint met een beschrijving van de replicatie cyclus van deze virussen. Daarna worden de moleculaire mechanismen van het cellulaire proces autofagie beschreven. In het derde deel wordt de huidige kennis aangaande de rol van autofagie tijdens virale infectie beschreven. Hierbij ligt de nadruk op het wel/niet initiëren van autofagie tijdens infectie en het gevolg hiervan op virus replicatie. Uit het hoofdstuk komt naar voren dat het nog niet precies duidelijk is welke rol autofagie speelt in het infectieproces van deze virussen. Er is veel tegenstijdige informatie gepubliceerd en systematisch onderzoek is nodig om tot een eenduidig antwoord te komen.

In **hoofdstuk 3** is de invloed van 50 autofagie eiwitten en receptoren op dengue virusinfectie onderzocht inmiddels een siRNA screen. Voor de screen is een recombinant dengue virus gebruikt met een gen coderend voor groen fluorescerend eiwit (GFP). Het GFP-signaal werd gebruikt als graadmeter voor infectie/replicatie van het virus. In de studie werden Huh7 cellen gebruikt omdat hepatocyten geïnfecteerd worden tijdens een natuurlijke infectie en omdat deze cellen eerder zijn gebruikt in autofagie studies. Achtenveertig uur na siRNA behandeling werden de cellen geïnfecteerd met het virus en weer 28 uur later werd de GFP-intensiteit per cel en per well bepaald middels microscopie. Cellulair DNA werd aangekleurd met Hoechst. Met

behulp van de screen zijn 11 eiwitten geïdentificeerd die een significant effect hebben op dengue virusinfectie. De screenresultaten laten zien dat depletie van ATG4 (alle isovormen), BECN1, LC3A, LC3C, ATG2B, ATG10, ATG13, ZFYVE1 en UVRAG dengue virusinfectie versterkt wat laat zien dat deze eiwitten een antivirale functie hebben. Depletie van het eiwit NBR1 daarentegen bleek het aantal dengue virus geïnfecteerde cellen te reduceren maar die cellen die geïnfecteerd waren hadden een hogere GFP-intensiteit. Dit suggereert dat NBR1 de kans op succesvolle infectie bevordert maar later in infectie virus replicatie tegengaat. In totaal heeft slechts een klein aantal (10) van de eiwitten betrokken bij het autofagie proces een antiviraal effect waardoor het aannemelijk is dat autofagie als geheel geen belangrijke rol speelt tijdens een dengue virusinfectie in Huh7 cellen. Voor veel van de geïdentificeerde eiwitten zijn ook 'alternatieve' functies beschreven en verder onderzoek is nodig om bepalen welke rol deze eiwitten precies spelen tijdens een dengue virusinfectie.

In **hoofdstuk 4** is de rol van eiwitten en receptoren betrokken bij autofagie onderzocht voor het chikungunya virus. Hiertoe is dezelfde procedure gebruikt als beschreven in **hoofdstuk 3**. Voor deze screen werden U2OS cellen gebruikt en de screenresultaten werden 17 uur na infectie uitgelezen. Uit de resultaten van de screen blijkt dat 10 autofagie eiwitten een effect hebben op chikungunya virusinfectie. Reductie in het expressieniveau van 9 van deze eiwitten (ULK1, ULK4, ATG4C, ATG7, LC3B, GABARAPL2, ATG9B, NBR1 en BNIP3) stimuleert chikungunya virusinfectie, hetgeen impliceert dat deze eiwitten een antivirale werking hebben. Reductie van UVRAG had een negatief effect op infectie wat suggereert dat UVRAG chikungunya virusinfectie juist stimuleert. Het grootste effect werd gemeten voor het eiwit 'BCL2 interacting protein 3' (BNIP3), een eiwit die staat beschreven als een autofagie receptor voor mitofagie (selectieve afbraak van mitochondria middels autofagie). Daarnaast blijkt BNIP3 ook een rol te spelen in celdoodprocessen. Validatie-experimenten bevestigden dat depletie van BNIP3 chikungunya virusinfectie stimuleert en leidt tot een hogere productie van nieuwe virusdeeltjes. Omdat niet alleen BNIP3 maar ook 8 andere eiwitten betrokken bij autofagie een effect hebben op chikungunya virusinfectie is eerst onderzocht of autofagie wordt geïnduceerd tijdens infectie in U2OS cellen. Uit de resultaten blijkt dat autofagie niet wordt geïnduceerd onder de gekozen experimentele condities van de screen. Het is daarom aannemelijk dat de geïdentificeerde eiwitten infectie beïnvloeden door te interfereren met basale autofagie in cellen of door 'alternatieve' functies. BNIP3 speelt als autofagie receptor in mitofagie een rol in het opruimen van defectieve mitochondria. We hebben daarom onderzocht of de mitochondriale massa tijdens een chikungunya virusinfectie wordt beïnvloed en welk effect BNIP3 depletie hier op heeft. Er werd geen verschil gemeten in de mitochondriale massa ten tijde van een chikungunya infectie. Vergelijkbare resultaten werden verkregen onder condities van BNIP3 depletie. Samenvattend, BNIP3 lijkt geen rol te spelen in de homeostasis van mitochondria tijdens een chikungunya virusinfectie. Vervolgens werd de rol van BNIP3 in celdood onderzocht. De totale celdood nam toe over de tijd en naar mate een hogere infectiedosis werd gebruikt. Echter, depletie van BNIP3 had geen vertragend/inhiberend effect op celdood hetgeen suggereert dat BNIP3 chikungunya virusinfectie controleert onafhankelijk van de betrokkenheid van BNIP3 in celdoodprocessen. Concluderend laten de resultaten zien dat BNIP3 chikungunya virus controleert onafhankelijk van de

toe nu beschreven functies van dit eiwit. Om meer inzicht te krijgen in de functie van BNIP3 hebben we vervolgens onderzocht waar in de replicatiecyclus van het chikungunya virus BNIP3 infectie reguleert. We hebben aangetoond dat BNIP3 chikungunya virusinfectie vroeg reguleert want al na 4 uur infectie werd een verhoogd aantal virale RNA kopieën gedetecteerd in BNIP3-depleteerde cellen. BNIP3 lijkt echter geen rol te spelen in virus cel opname en de inductie van membraan hemifusie. Dit samen leidt tot de hypothese dat BNIP3 een rol speelt in de afgifte van het virale nucleocapside in het cytoplasma van de cel en/of het vrijkomen van virale RNA voor replicatie en/of een rol speelt in de initiële vorming van replicatiecomplexen. Interessant hierin is dat BNIP3 is aangetoond in rab5-positieve endosomen, het cellulaire organel waar chikungunya virus membraanfusie plaatsvindt. Het verhoogde aantal virale RNA moleculen in BNIP3-gedepleteerde cellen correleert met een verhoogd aantal geïnfecteerde cellen later in infectie en leidt een hogere productie van nieuwe virusdeeltjes. Depletie van BNIP3 verhoogd de secretie van twee verschillende chikungunya virusstammen en ook dat van het nauw verwante Semliki Forest virus. Samenvattend in dit hoofdstuk is een nieuwe antivirale cellulaire gastheerfactor geïdentificeerd. BNIP3 reguleert chikungunya virusinfectie vroegtijdig in infectie en nader onderzoek is nodig om het exacte moleculaire mechanisme hierachter te ontrafelen.

In **hoofdstuk 5** is onderzocht of miRNAs een belangrijke rol spelen tijdens een dengue virusinfectie. MiRNAs zijn kleine (20-25 nucleotiden lang) niet-coderende RNA moleculen die de expressie van cellulaire genen reguleren en zodoende dus een rol spelen in vele cellulaire processen. Eerder is aangetoond dat het cellulaire miRNA landschap kan veranderen tijdens een virusinfectie en onderzoek heeft laten zien dat miRNAs zowel direct als indirect het infectieproces van virussen kunnen beïnvloeden. In dit hoofdstuk hebben wij het miRNA landschap bepaald in primaire macrofagen en deze vergeleken met het miRNA landschap in dengue virus geïnfecteerde macrofagen en met niet-geïnfecteerde macrofagen die wel zijn blootgesteld aan het virus. Kortom de macrofagen werden geïncubeerd met het dengue virus en 24 uur na infectie gescheiden in twee populaties: geïnfecteerde macrofagen en niet-geïnfecteerde macrofagen die wel zijn blootgesteld aan het virus. Als controle werd ook UV-geïnactiveerd virus gebruikt om de rol van virus replicatie te onderzoeken. Het miRNA landschap werd bepaald door middel van 'deep-sequencing'. Incubatie met UV-geïnactiveerd dengue virus had geen effect op het miRNA landschap in macrofagen. Dit laat zien dat vermenigvuldiging van het genetisch materiaal van het virus nodig is om veranderingen in miRNA expressieniveau te bewerkstelligen. In dengue virus geïnfecteerde cellen werd een veranderde expressie van miR-4508, miR-3960 en miR-4301 gemeten. MiR-4508, miR-3960, miR-3614-5p en miR-181a-3p hadden een veranderd expressieniveau in niet geïnfecteerde macrofagen die wel zijn blootgesteld aan het dengue virus. In het algemeen kan gesteld worden dat het expressieniveau van slechts weinig miRNAs werd beïnvloedt door infectie waaruit geconcludeerd kan worden dat miRNAs geen grote rol spelen in het controleren van een dengue virusinfectie. Het expressieniveau van miR-3614-5p en miR-181a-3p was specifiek verhoogd in niet-geïnfecteerde cellen die zijn blootgesteld aan het dengue virus, hetgeen suggereert dat deze microRNAs een antivirale werking zouden kunnen hebben. Vervolgonderzoek liet inderdaad zien dat overexpressie van miR-3614p een

negatief effect heeft op de productie van dengue virusdeeltjes. Hetzelfde werd waargenomen voor het West-Nile virus, welke verwant is aan het dengue virus. Er werd geen effect waargenomen bij overexpressie van miR181-a, miRNA-4508, miR-3960 en miR-4301. Met behulp van eiwitmassaspectrometrie zijn vervolgens 29 eiwitten geïdentificeerd waarvan het expressieniveau zou kunnen worden gereguleerd door miR-3614-5p. Individuele miRNAs kunnen het expressieniveau van meerdere eiwitten reguleren omdat een miRNA voor genregulatie niet volledig complementair hoeft te zijn aan het mRNA. Een van de geïdentificeerde eiwitten is adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1). Validatie experimenten bevestigden dat miR-3614-5p het expressieniveau van ADAR1 reguleert. Daarnaast bleek ADAR1 dengue virus replicatie te stimuleren vroegtijdig in infectie. Samenvattend, in deze studie is een miRNA geïdentificeerd met antivirale eigenschappen tegen het dengue virus. MiR-3614-5p controleert de expressie van ADAR1 en een reductie in ADAR1 expressie heeft een negatief effect op dengue virus replicatie. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de andere 28 geïdentificeerde eiwitten ook gereguleerd worden door miR-3614-p en of deze eiwitten een rol spelen tijdens een dengue virusinfectie.

In het afsluitende hoofdstuk, **hoofdstuk 6**, zijn de resultaten van het proefschrift samengevat en beschreven in een bredere context.

Curriculum vitae

Personal information

Name	Sandra Liliana Echavarria Consuegra
Date and place of birth	23 rd of February, 1987. Medellin, Colombia
Email	sl.echavarria.consuegra@gmail.com

Education

2014 - 2019	PhD, Department of Medical Microbiology, University of Groningen Groningen, The Netherlands
2013 - 2018	MSc, Biomedical Sciences, University of Antioquia Medellin, Colombia
2007 - 2012	BSc, Microbiology and bioanalysis, University of Antioquia (with honors) Medellin, Colombia

Publications

Liliana Echavarria-Consuegra, Jolanda M. Smit and Fulvio Reggiori. 2019. Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flaviviruses. *Open Biology*.

Mayra Dios-Toro, **Liliana Echavarria-Consuegra**, Jacky Flipse, Geysson Javier Fernández, Joost Kluiver, Anke van den Berg, Silvio Urququi-Inchima, Jolanda M. Smit. 2017. MicroRNA profiling of human primary macrophages exposed to dengue virus identifies miRNA-3614-5p as antiviral and regulator of ADAR1 expression. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.

Acknowledgements

This thesis could not have been completed without the great support I have received from my supervisors, colleagues, friends and family throughout the years. For that reason, I would like to finish this book with a few words, surely not enough, to thank the people that have been involved in this process, and that in one way or another have shaped the person I am today. This is perhaps the most important part of my thesis, and I write it with the most profound and sincere gratitude.

First and foremost, I would like to thank my supervisor **Jolanda Smit**. Thank you for believing in me from the beginning, when I joined your group for my Master's internship. Despite not really knowing me personally or my work, you trusted me and allowed me to come to The Netherlands in order to pursue new and exciting academic and personal experiences. I had never left my country before, and everything that came after my arrival to Groningen has turned into the most important and transforming years of my life. Thank you for guiding me through all my projects, and for supporting me through the constant failures. I also deeply appreciate all the effort you put into writing this thesis. Most importantly, thank you for visiting my family in Colombia and for 'returning the favour' when my mom came to visit me in The Netherlands. It was very special for us to share this moment with you and your family. I really admire that you are a people person, and I truly believe that this is one of the greatest qualities you have as a supervisor.

Next, I want to express my acknowledgements to **Fulvio Reggiori**, my co-promoter, whom I value for the endless discussions about autophagy and the effort he put in the writing and editing of this thesis. You were always prompting to improve our research and we surely got a new perspective from you. I look forward to finally publish our paper and to more rewarding collaborations in the future. I also want to express my gratitude to **Mario Mauthe** for always being willing to answer my numerous questions and for being the source of many ideas that framed the research included in this thesis. It was nice to work and collaborate with you.

I also want to take the opportunity to thank the members of my reading committee, **Prof. Han Moshage**, **Prof. Harrie Kampinga** and **Prof. Frank v Kuppeveld** for evaluating this thesis in speed mode.

I had the opportunity to work and interact with wonderful people in the **Virology and Immunology** group. **Anke** and **Toos**, thank you for all the questions and fruitful discussions about science and life during work discussions, lunch-time, coffee breaks and borrels. **Iza**, your passion and positivity is contagious, I have such an admiration for you as a person and as a scientist. Your input and 'eagle eye' for data was always very valuable. Thank you for proof-reading my thesis, and for always showing genuine interest in my projects. **Jolanda O**, **Jacqueline**, **Marijke**, **Annemarie**, **Baukje-Nynke**, **Denise** and **Heidi**; thank you for keeping things working in the lab and for all the planning and effort you put into the mundane –but very much indispensable– tasks.

To all the current and previous members of the **Virology and Immunology** group, thank you for all your suggestions about my research and for sharing your

technical expertise. **Mareike, Tabitha, Jacky, Stephanie, Dong-Wei, Julia, Mariana, Maartje, Pepe;** thank you for welcoming me and making me feel included when I started; I hope I have not disappointed you. **Renée**, you were also part of the lab when I started, and you were almost the first 'Dutchy' that really embraced me; you quickly became my partner in crime in the lab and also my friend. Thank you for opening the doors of your home to me. It was lovely to share my first real Dutch Christmas with your family. Thank you for always being supportive and for giving me a positive perspective.

As a proud member of the **Experimental Virology** group I have to acknowledge **Ellen, Berit, Beto, Nilima, Vinit, John, and Bram**, for making day to day work in the lab so enjoyable; I will truly miss our countless hours of fun in and out of the ML3. **Denise**, I highly appreciate all the effort you put into the last experiments required to complete this thesis and for all the fun times outside the lab.

I also had the opportunity to share the lab, office space, lab outings, Christmas parties, Sinterklaas celebrations, dinners and coffee breaks with nice people from all over the world. I have to say I truly cherish every single one of you and I tried to learn from you and your cultures. **Aurora, Fede, Doni, Nilima, Amrita, Yoshita, Beto, Cesar, Milena, Georgia, Gabi, Ellen, Berit, Dashak and Shi-Peng;** thank you for the snacks, the food, the drinks and the life-changing conversations about languages, aging, 'adulthood', and PhD life. **Ellen and Berit;** thank you for being my paranymphs. I feel like despite us being so different you really know me and get me. It makes me immensely happy to call you my friends. Thank you for all the nice moments together, for teaching me new things and for opening my eyes to new and exciting experiences. My gratitude is also extended to **Malte and Erwin** for sharing all those nice moments with us.

Prior to my arrival to The Netherlands there were many people that certainly helped to shape who I am today and that were part of my training and education. I must say I feel extremely proud of the academic formation that I obtained in Universidad de Antioquia and I would like to thank all my teachers and professors from my years there. **Silvio**, thank you for receiving me in your group, for giving me independence and for allowing me to move forward when it was time for me to come to The Netherlands. To all my virology teachers, thank you for giving me the foundation to embark in this journey. **Silvio, Javier, Maria T, Paulita, JuanCa, Luis F Barrera, Juan C Gallego and Macris:** I really enjoyed all of your seminars and I have to admit that I miss the approach we have in the Alma Mater. I learnt so much from all of you and I have great respect for your work. I also feel very grateful for my friends and colleagues from the **Inmunovirología** group in Colombia, we had lots of fun and I learnt everything from you. **Camilo and Andrés**, thank you for all the 'lab lessons'; **Dianita, Dani, Sandra, Jahnnyer, John, Wbe, Anita, Angelita:** gracias por todo su apoyo en el lab y su amistad cuando empecé en el grupo. **Lanie**, from the beginning you were always a true friend, thank you for your non-judgemental attitude towards me.

Luz Yaneth, Isabel, Helena Grot and Diana Narvaez. Thank you for being part of my forming team in the early years of my career as a microbiologist, and for being motivating, enthusiastic and most of all welcoming and kind. **Luz Yaneth**, you

are such a raw and authentic person, your approach to life and research has always been very inspiring; I will never stop learning from you. Thank you for showing interest in my life and for always listening to all my crazy life stories with great curiosity. It has always been a pleasure to call you not only my teacher, 'asesora', but also my friend.

I came to the Netherlands and found an amazing Colombian/Latin community that carried me through the rainy and depressing seasons. You made my stay here a little bit easier despite being so far from home. I can truly say that all the things we have shared have completely transformed me as a person. **Mayra**, you were the direct cause of my 'short trip' to Groningen and I deeply owe you for that. Thank you for all your lessons on virology and life. **Stefy, Jorgito, Esmee, Julio, Fifi, Nils, Ayden, Mitch, Laura, Tim, Viviana M, Angelica, Genaro, Vaquera**; thank you for all the fun times and for being so nice to me. **David** and **Alejito**, thank you for being my friends and for the countless hours of fun and laughter. **Dieguito, Cris**; thank you for allowing me to stay till so late at your house for long philosophical conversations. **Ailincita**, in you I found so many traits of my own personality. Thank you for making me feel at ease to share those bits with you. **Marty**, the sweetest, but also the naughtiest, what a joy it has been to have you around. **Alfred**, thank you for being my friend, for all the life advice, for the amazing trips, the Colombian food, for taking care of me when I was sick, and making 'caldito' for my hangovers. It makes me extremely happy that you will be supporting me as my paranymp on this day. To all of you and also to **Gabi, Jens, Javier, Maria** and **Negrito**; thank you for being so much fun and for all the jokes that always helped to heal my soul.

I also want to thank my family and closest Colombian friends, but for that, I must continue in Spanish.

Anita, Susy, Ely, Vero; infinitas gracias por estar siempre ahí, acompañándome, a pesar del tiempo y la distancia. Gracias por su inquebrantable amistad, por aguantarme todas mis locuras y por entenderme tal cual soy. Mil gracias a **Susy y Anita** por las largas noches de estudio para los parciales de bacte, mico y para. ¡Las adoro! Yo sé que siempre encontraremos un punto en el cual nos encontraremos y continuaremos siendo amigas. **Tatiana, Johanna Arroyave**, y todas las demás personas que conocí en la Escuela de Microbiología gracias también por su autenticidad y amistad.

Dicen por ahí que lo más importante después de todo es la familia. **Mamá**. Gracias por tu infinito amor, por creer en mí, por enseñarme la importancia del estudio, del trabajo duro y de la humildad. Gracias por ser fuente de inspiración y por haber sido tan guerrera. Gracias también por tú infinita paciencia, incluso cuando era una completa incertidumbre en donde iba yo a parar. **Álvaro**. Gracias por ser mi papá, admiro mucho tu capacidad de tomar las cosas con calma y tu amor a la música. Gracias por enseñarme que 'a pesar de los problemas familia es familia y cariño es cariño'. **Mary** y **Ena**, hermanitas, gracias por creer en mí y por preocuparse por mi bienestar durante todos estos años creciendo juntas. **Ena**, agradezco tu creatividad y aporte para el diseño de la portada de esta tesis. **Mary**, gracias por siempre haber estado de mi lado; quiero aprender de ti a ser berraca, pujante y trabajadora. **Sarita**,

José Pablo y **Ricardo**, ime traen tanta felicidad y les tengo tanto cariño! **Mateo**, no sabes cuánto te quiero y ser tu madrina me llena de motivos para ser mejor persona cada día. Mis agradecimientos se los extiendo también a **Juli** y **Mauro** por cuidar de mis sobrinos.

A todos mis **tíos** y **tías**, incluyendo a los 'no oficiales' (memo Jaramillo, Gloria Pipe, Margarita, Gloria León) y también al 'combo' de **Baranoa**; a todos mis **primos** y **primas**; gracias por hacer parte de mi familia, y por su incondicional cariño. **Diana** y **Tatis**, fue muy bonito crecer juntas, jugar a ser niñas y a ser grandes. Gracias a ustedes tengo los recuerdos más bonitos de mi infancia. De Navidades en Envigado y en Villa Sofía. **Diana**, siempre serás parte de mi vida y eres una de mis más inmensas motivaciones. **Carlos Mario** y **Sebas**, gracias por ser también parte de ésas lindas memorias.

At last, I want to acknowledge **Vlad**. There are no words to express how grateful I am that I have met you. Thank you for never giving up on trying to understand me, for helping me to rationally sort out my problems, for sharing your living space with me, for all the enjoyable times together and for your unbreakable love, respect and loyalty. Так же я хотела бы поблагодарить твою семью, которая так радушно приняла меня в вашем доме. Я восхищаюсь тем как вы относитесь друг к другу, мне это очень понравилось. Вы очень честные, открытые и добрые. Ваше гостеприимство меня приятно удивило, и для меня было особенным разделить так много хороших моментов вместе со всеми вами. **Татьяна** и **Юрий**, вы точно знали, что мой желудок — это путь к моему сердцу ☺.

Thank you all from the bottom of my heart. The END.