



PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARA REALIZAR LA PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE SECUENCIACIÓN DE TRANSCRIPTOMA MEDIANTE RNASEQ EN EL MARCO DEL PROYECTO CON CÓDIGO PI22/01859 PARA LA FUNDACIÓN INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU.

EXP. NEGSPIR 23/33



Barcelona, a 6 de junio de 2023

El objeto de este pliego de prescripciones técnicas es el de definir las características mínimas a cubrir por la oferta y posterior contrato de servicios.

Este contrato es objeto de cofinanciación por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa”, derivado del proyecto de investigación con código PI22/01859 *“Análisis integrado de datos genómicos y transcriptómicos para el avance en el conocimiento molecular y diagnóstico de las miopatías”*.

A. DESCRIPCIÓN DEL CONTRATO:

A.1. Antecedentes

El objetivo de la Fundació Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (FIRHSCSP) es promover la investigación básica, clínica, epidemiológica y de servicios sanitarios en el campo de las ciencias de la salud y la biomedicina, con el último objetivo de contribuir a la mejora de la salud de la población.

Con este objetivo de contribuir a la mejora de la salud de la población, el estudio *“Análisis integrado de datos genómicos y transcriptómicos para el avance en el conocimiento molecular y diagnóstico de las miopatías.”* pretende explorar y desarrollar las posibilidades de la tecnología RNASeq, en cohortes de pacientes con patologías neuromusculares concretas, para lograr su diagnóstico genético definitivo y analizar las causas moleculares que subyacen a este grupo de patologías.

Las miopatías constituyen un amplio grupo de patologías, clínica y genéticamente heterogéneas, que afectan al músculo esquelético y cursan con debilidad muscular como rasgo principal. A menudo, el músculo respiratorio y cardíaco también se ven

El expediente NEGSPIR 23/33 es objeto de cofinanciación por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa”.

comprometidos. Alrededor del 50% de los casos debutan en la edad infantil, aunque los síntomas iniciales pueden aparecer en cualquier etapa de la vida desde el nacimiento hasta la edad adulta, y en la mayoría de los pacientes provocan una progresiva debilidad y atrofia muscular que conduce a una discapacidad de gravedad variable con un alto impacto familiar y social. Desafortunadamente, no existe un tratamiento curativo para la gran mayoría de estas entidades. Sin embargo, gracias al desarrollo de las herramientas moleculares, estamos comenzando a ser testigos de la traducción clínica sin precedentes de las terapias génicas. Esto hace que sea esencial que cada paciente haya sido genéticamente diagnosticado. Hasta la fecha se han identificado más de 450 genes implicados en estas patologías y gracias a la secuenciación masiva, se ha logrado un enorme progreso en la caracterización genética de las enfermedades musculares, en términos de tiempo y coste-efectividad. No obstante, alrededor del 50% de pacientes con enfermedades mendelianas raras continúan sin diagnóstico genético preciso tras aplicar la secuenciación masiva (panel de genes, exoma o genoma). Además, el resultado de la secuenciación masiva de ADN conlleva inevitablemente la identificación de variantes de significado incierto (VUS) que requieren estudios funcionales para confirmar o excluir su patogenicidad, y por tanto poder establecer un diagnóstico certero.

Como el Grupo de Investigación en Enfermedades Genéticas de la FIRHSCSP ya observó en anteriores trabajos, el estudio de RNA mensajero extraído de biopsia muscular permite observar los efectos, inesperados a priori, que pueden tener determinadas mutaciones de tipo missense y sinónimas sobre la transcripción génica. Dado que es habitual disponer de muestra de biopsia muscular de los pacientes que sufren enfermedades neuromusculares, es factible estudiar el transcriptoma en el tejido diana y entender mejor cuáles son los eventos moleculares que dan lugar al desarrollo de la patología. En este sentido, la secuenciación del transcriptoma completo mediante tecnología RNASeq resulta particularmente interesante debido a la observación del efecto que tienen las variantes identificadas en el ADN a nivel de los transcritos generados, los cuales serán posteriormente traducidos a proteína. Así, el estudio del transcriptoma permite una validación funcional de muchas de las VUS identificadas en ADN ya que permite profundizar en mecanismos moleculares que no podrían ser identificados mediante otro tipo de aproximaciones genéticas.

En el anterior proyecto con código PI18/01585 y título "*Análisis del transcriptoma mediante RNA-Seq en pacientes con patología neuromuscular no resuelta tras secuenciación de exoma: optimización del algoritmo diagnóstico*" (Convocatoria Proyectos de investigación en salud, AES 2018), llevado a cabo por el mismo grupo de investigación, se tuvo la oportunidad de evaluar la tecnología RNASeq como herramienta diagnóstica para un grupo de pacientes, que, a pesar de haberse sometido

a diversos estudios moleculares, seguían sin causa genética identificada. Mediante el citado proyecto pudimos establecer la metodología apropiada para obtener RNAs de calidad, algoritmos de análisis de datos e interpretación de los mismos. Se obtuvieron resultados muy prometedores que permitieron diagnosticar a un porcentaje notable de pacientes e identificar mutaciones genéticas que no se hubieran podido detectar mediante otros métodos genómicos.

Por todo ello, y actualmente con una mejor comprensión y habilidad para tratar la técnica y el manejo de datos procedentes de la secuenciación del transcriptoma, queremos seguir desarrollando esta tecnología aplicada al estudio de las enfermedades neuromusculares, en esta ocasión dirigida a cohortes específicas de pacientes, para aumentar la potencia diagnóstica y explorar más a fondo las vías genéticas implicadas en el desarrollo de estas enfermedades.

En definitiva, la aplicación de la tecnología RNA-Seq a pacientes con patologías neuromusculares específicas permitirá:

- Visualizar los efectos de las variantes localizadas en regiones no codificantes del genoma y no detectadas mediante secuenciación de DNA genómico, lo que nos permitirá identificar la mutación responsable de la enfermedad, tanto en genes ya relacionados previamente con la patología, como en nuevos genes.
- Mejorar la interpretación de la variación observada en DNA genómico integrando la información funcional obtenida mediante RNA-Seq, aprovechando que ésta última permite mostrar las alteraciones y consecuencias a nivel transcripcional como consecuencia de variantes en el genoma. Por consiguiente, se podrá hacer una reclasificación de las variantes que a nivel genómico no aportaban información suficiente sobre su implicación en la patología.
- Establecer patrones concretos de expresión génica que correlacionen con un fenotipo o rasgos clínicos concretos y puedan ser utilizados como biomarcador de la progresión de la enfermedad o para la estratificación de pacientes de cara a su inclusión en ensayos clínicos.

Por último, cabe resaltar que hoy en día se estima que la aplicación de RNA-Seq puede mejorar y aumentar hasta un 30% la tasa de diagnóstico molecular en pacientes con enfermedades mendelianas.

A.2. Objetivos del proyecto:

El expediente NEGSPIR 23/33 es objeto de cofinanciación por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa".

- 1) Mejorar la identificación del defecto genético responsable de las enfermedades musculares raras, mediante el desarrollo y validación una estrategia genética que combine el análisis de datos genómicos y transcriptómicos, que permita complementar y mejorar las tasas diagnósticas de las enfermedades neuromusculares de origen genético.
- 2) Reclasificar variantes de significado incierto detectadas a nivel de ADN genómico, mediante su interpretación funcional a nivel transcriptómico.
- 3) Establecer patrones de expresión diferenciales que puedan ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico y/o pronóstico en ausencia de biomarcadores séricos específicos.
- 4) Profundizar en el conocimiento de las bases moleculares y la fisiopatología de las enfermedades neuromusculares de origen genético para la identificación de dianas de acción terapéutica.
- 5) Descubrir nuevos genes y/o mecanismos moleculares responsables de enfermedades neuromusculares de origen genético.

A.3. Objeto del Contrato:

El objeto del contrato es el servicio de secuenciación de transcriptoma (NGS de RNA total; 100M/muestra) y el análisis bioinformático de RNA-Seq (expresión diferencial y alineamiento) para la Fundació Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

La prestación de este servicio es esencial para desarrollar el proyecto con código PI22/01859 *"Análisis integrado de datos genómicos y transcriptómicos para el avance en el conocimiento molecular y diagnóstico de las miopatías"*.

A.4. Necesidades a cubrir:

- ☐ Cuantificación fluorimétrica de los RNAs.
- ☐ Generación de librerías y Secuenciación de total RNA
- ☐ Análisis bioinformático de RNASeq (expresión diferencial y alineamiento).

B. PLAZO DE EJECUCIÓN

El expediente NEGSPIR 23/33 es objeto de cofinanciación por el Instituto de Salud Carlos III y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa".



El plazo de ejecución del contrato tendrá una duración de 3 años, a contar desde el día siguiente a la formalización contractual. Puede ser necesaria la prórroga de un año según el ritmo de reclutamiento del estudio, siempre que se cuente con la previa autorización del Instituto de Salud Carlos III para prorrogar la duración del Proyecto, y sin ampliación presupuestaria.

Los resultados de cada secuenciación de transcriptoma deberán ser entregados en un plazo no superior a 45 días naturales des de su realización.

C. CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

El servicio secuenciación, anteriormente especificado, que necesita el Institut de Recerca implica una serie de especificaciones técnicas que se enumeran a continuación. Estas especificaciones técnicas se han fijado con el objetivo de mantener unas condiciones de secuenciación y análisis idénticas a las aplicadas a las muestras procedentes del proyecto desarrollado anteriormente (PI18/01585). La idea es agrupar los datos de transcriptoma obtenidos del proyecto anterior con los que se obtengan en el presente proyecto, alcanzando así una N de análisis mucho mayor. Para que los resultados sean fehacientes es imperativo minimizar la variabilidad técnica y analítica entre las diferentes muestras procesadas.

Para ello, debe desarrollarse el mismo protocolo que se aplicó a las muestras ya procesadas anteriormente:

- a. Generación de librerías: TruSeq Stranded Total RNA, Illumina. Secuenciación del transcriptoma en plataforma NovaSeq, Illumina. Las lecturas obtenidas se alinearán contra el genoma de referencia mediante HISAT2. Posteriormente, el ensamblado de los transcritos y la cuantificación de su abundancia se realizará mediante StringTie y Ballgown. Tras el filtrado de transcritos y genes con poca cobertura de lecturas y un análisis exploratorio de los datos, se realizará el análisis de expresión diferencial mediante el paquete de R DESeq2.
- b. Además de un primer análisis global a nivel de expresión génica, se identificarán por un lado outliers de expresión en las muestras mediante el paquete de R/Bioconductor OUTRIDER (OUTlier in RNA-Seq fInDER) y, por otro, eventos de splicing aberrantes presentes en las muestras incluidas en el estudio con el paquete FRASER (Find RAre Splicing Events in RNA-seq). El análisis de



expresión diferencial y en la detección de outliers de expresión y de splicing alternativo se realizará conjuntamente con las muestras de RNAseq de biopsias musculares obtenidas en el anterior (proyecto PI18/01585, n=37) aportando así mayor potencia estadística al estudio.

- c. Aplicar un protocolo técnico (preparación y secuenciación de librerías) idéntico y un análisis informático unificado permitirá a los investigadores aumentar la potencia estadística de los resultados y medir las variables de estudio.

D. METODOLOGÍA DE TRABAJO

La empresa adjudicataria es la responsable de prestar los servicios que se detallan en las características técnicas en el plazo de ejecución previsto.

Además, la empresa adjudicataria deberá asumir los siguientes compromisos:

- Compromiso a proporcionar soporte en el análisis bioinformático de datos y a su interpretación.
- Compromiso de almacenamiento de datos durante la vigencia del contrato (3 años), y optativamente indefinido una vez que acabe este plazo.
- Compromiso de garantía sobre el servicio: En caso de fallo técnico, se repetirá la prueba sin coste adicional para la Fundació Institut de Recerca. El plazo mínimo de garantía es de 6 meses.

La facturación del servicio se realizará a medida que se hagan las pruebas, con la opción de hacer una única factura anual o facturas mensuales, bajo petición del solicitante.

E. RESPONSABILIDADES Y OBLIGACIONES DEL ADJUDICATARIO

El contratista asumirá las responsabilidades y obligaciones que se exponen a continuación:

- El contratista será responsable de la calidad técnica del servicio así como de las consecuencias que supongan para la Fundació Institut de Recerca o terceros, las omisiones, errores, métodos inadecuados o conclusiones incorrectas a la hora de ejecutar el contrato.



- El contratista no podrá ceder o subcontratar las prestaciones del servicio del presente contrato sin autorización previa del centro.
- El contratista garantizará el cumplimiento de la normativa comunitaria, estatal, autonómica y local aplicable en el momento de realizar las tareas objeto del contrato y cualquier otra disposición oficial que se publique durante la vigencia del contrato.

F. PROCEDIMIENTOS GENERALES

El contratista asumirá los procedimientos generales que se exponen a continuación:

- ☐ La Fundació Institut de Recerca no reconocerá ningún trabajo realizado fuera de los procedimientos indicados en el presente Pliego de Condiciones Técnicas o de las normas complementarias que se establezcan, o que no cuenten con su previa conformidad, aunque hayan sido solicitados por cualquier persona relacionada con ella, a cualquier nivel de responsabilidad.
- ☐ La Fundació Institut de Recerca no se hará cargo de ningún gasto producido como consecuencia de una intervención no autorizada, reservándose la facultad de reclamar – si procediese – compensación por daños y/o perjuicios que se pudieran derivar.
- ☐ La Fundació Institut de Recerca ejercerá en todo momento las funciones de seguimiento, inspección y control de la prestación del servicio, tomando las medidas que considere oportunas para el correcto cumplimiento de las obligaciones a que se deberá someter el contratista como consecuencia del presente Pliego de Condiciones, así como del contrato que se deriva.

G. OTROS COMPROMISOS DEL CONTRATISTA

El contratista se compromete al correcto desarrollo del servicio, con el uso de todos los medios necesarios para su adecuada calidad. El contratista se compromete a la correcta



y adecuada realización del servicio con la calidad necesaria y con la incorporación de todas las medidas técnicas que sean precisas para prestar un servicio de esta naturaleza.

H. CONFIDENCIALIDAD Y PROTECCIÓN DE DATOS

Toda la información facilitada por la Fundación Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau es confidencial y de su propiedad, por lo cual el licitador y cualquier persona dependiente del mismo que ejerza las funciones objeto de este contrato tendrá que mantener la confidencialidad plena sobre la información inherente.

En relación con los datos personales a los que pueda tener acceso en ocasión del contrato, la empresa contratista, deberá cumplir todo aquello que se establece en el Reglamento (UE) 2016/679, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo relativo al tratamiento de datos personales y libre circulación de estos datos y por el cual se deroga la Directiva 95/46/CE, en adelante el RGPD, a la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de protección de datos y garantía de los derechos digitales y al resto de normativa vigente en materia de protección de datos.