



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI
Fundació URV

**PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS QUE RIGEN LA CONTRACTACIÓN DEL
SERVICIO DE PROTEÓMICA EN MUESTRAS HUMANAS DE SUERO Y HÍGADO PARA
LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES NO INVASIVOS EN LA ESTEATOHEPATIS
NO ALCOHÓLICA**

Exp.Núm. FURV2023-05

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS QUE RIGEN LA CONTRACTACIÓN DEL SERVICIO DE PROTEÓMICA EN MUESTRAS HUMANAS DE SUERO Y HÍGADO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES NO INVASIVOS EN LA ESTEATOHEPATIS NO ALCOHÓLICA

Exp.Núm. FURV2023-05

El contenido de estas prescripciones técnicas deriva del proyecto IT20041S.

Con la mera presentación de su oferta, la empresa licitadora acepta las prescripciones técnicas establecidas en este pliego.

Cualquier propuesta que no se ajuste a los requerimientos mínimos establecidos en este pliego quedará automáticamente excluida de la licitación.

1. Contexto

La **enfermedad el hígado graso no alcohólico (EHGNA)** es la patología crónica hepática más prevalente en todo el mundo. Esta va desde una enfermedad prácticamente benigna y silente como es la esteatosis simple, hasta involucrar componentes inflamatorios y/o de fibrosis como en la **esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)**, la cual puede dar lugar a cirrosis hepática y a cáncer hepático. Actualmente, no existe **ningún método diagnóstico no invasivo aprobado** para dicha enfermedad, por lo que el método por excelencia sigue siendo la biopsia hepática, la cual además de ser invasiva, puede conllevar complicaciones como sangrado y dolor. Este hecho presenta la gran necesidad de encontrar un biomarcador o un panel de biomarcadores de detección no invasiva con la capacidad de diagnosticar la EHNA.

En este sentido, las **técnicas ómicas**, son técnicas de alto rendimiento que ofrecen la identificación de muchos factores (metabolitos, proteínas, lípidos...) diferenciales entre condiciones biológicas, en un período corto de tiempo. Estas se han usado en los últimos años para la búsqueda de biomarcadores en diferentes enfermedades como el cáncer, entre otras. La **proteómica** ofrece la posibilidad de identificar y cuantificar proteínas y péptidos. La tecnología de espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución es idónea por su elevada sensibilidad, amplia cobertura de las diferentes clases de metabolitos, alto rendimiento y elevado rango dinámico.

El **grupo GEMMAIR** (de sus siglas en catalán “Grup d’estudi en malalties metabòliques associades a la insulino-resistència”) es un grupo multidisciplinar compuesto por profesionales sanitarios (internistas, cirujanos y patólogos) y personal de laboratorio (bioquímicos, técnicos de laboratorio y bioinformáticos) que tiene más de 15 años de experiencia en el estudio de la EHGNA y otras patologías metabólicas. El grupo posee una potente colección de muestras biológicas (sangre e hígado) de alrededor de 500 pacientes. A día de hoy, ya ha llevado a cabo numerosos estudios relacionados con la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad. Recientemente, el grupo ha realizado un estudio de **metabolómica** en suero (Bertran L, et al. Int J Mol Sci. 2023. 6;24(12):9789) y otro de **lipidómica** (datos no publicados) donde se han identificado metabolitos característicos de los pacientes con EHNA. Para conseguir una

detección completa de los factores relacionados con la EHNA, el grupo quiere realizar un **ESTUDIO DE PROTEÓMICA NO DIRIGIDA EN 240 MUESTRAS DE SUERO DE MUJERES CON OBESIDAD MÓRBIDA** (incluyendo un grupo de mujeres normo-peso como controles) **Y EN 150 BIÓPSIA HEPÁTICAS** para identificar las proteínas/péptidos diferenciales y determinantes que poseen estos pacientes.

De esta forma, los posibles resultados podrían ser complementados con los anteriormente encontrados en los estudios de metabolómica y lipidómica para así, generar un **panel de biomarcadores no invasivos** capaces de diagnosticar la EHNA.

La Fundació URV, en adelante FURV, tiene la necesidad de desarrollar este proyecto mediante la contratación del servicio de proteómica para el análisis de 240 muestras de suero y 150 muestras de tejido hepático. Las muestras de suero se dividirán en 60 muestras de pacientes con normo-peso (controles), 40 de pacientes con obesidad mórbida y hígado normal, 40 de pacientes con obesidad mórbida y esteatosis simple y 100 de pacientes con obesidad mórbida y EHNA. Las muestras de hígado se dividirán en 36 muestras de sujeto con obesidad mórbida y hígado normal, 59 de pacientes con obesidad mórbida y esteatosis simple y 55 de pacientes con obesidad mórbida y EHNA.

El grupo GEMMAIR se ubica principalmente en los módulos de docencia e investigación de la Universitat Rovira i Virgili, en el Campus Hospital Joan XXIII de **Tarragona**. Además, las muestras están almacenadas en el Biobanco IISPV de Tarragona, en el mismo hospital, por lo que la recogida de muestras puede darse de forma rápida y eficiente (en las condiciones de temperatura adecuadas).

2. Objeto del contrato o necesidad a cubrir

El presente Pliego tiene por objeto establecer las prescripciones técnicas particulares que regirán la contratación del servicio de proteómica en muestras humanas de suero y hígado para la identificación del perfil proteómico en pacientes con EHNA como estudio de investigación del grupo GEMMAIR.

Con la realización del referido objeto contractual, el órgano de contratación pretende cubrir las siguientes necesidades y/o funcionalidades:

- Identificar el conjunto de proteínas y péptidos que se encuentran en el suero sanguíneo y en el hígado de una cohorte de mujeres con obesidad mórbida y diferentes grados de afectación hepática, incluyendo un grupo control de mujeres sanas normo-peso.
- Encontrar que proteínas o péptidos son diferenciales y determine en una población de mujeres con EHNA y obesidad mórbida asociada.
- Determinar cuáles son los potenciales biomarcadores no invasivos de carácter peptídico/proteico adecuados para el diagnóstico de la EHNA.

Así pues, la caracterización del perfil proteómico en las muestras de suero y hígado de estas pacientes nos permitirá identificar los factores proteicos exclusivamente característicos de las

pacientes con EHNA, y así poder determinar cuáles podrían ser biomarcadores no invasivos de naturaleza proteica característicos de las mujeres con EHNA asociado a obesidad mórbida.

Cualquier información derivada del servicio será propiedad íntegra de la FURV, facilitando gratuitamente el licitador la información necesaria de los datos o el uso de los mismos, si se requiere de esta.

Por otro lado, cualquier comunicación o publicación generada de este servicio tendrá una referencia en métodos o en agradecimientos de la empresa contratista donde se haya llevado a cabo el servicio.

3. Actividades y funciones de la empresa contratista

Las funciones que debe asumir la empresa contratista son las siguientes:

- Recibir, tratar y analizar 240 muestras de suero (en frío a 4°C) y 150 muestras de hígado (congeladas con N₂ líquido a -96°C) procedentes de la colección OBH del grupo GEMMAIR. La empresa debe procesarlas en las condiciones adecuadas según indiquen los PNT del adjudicatario, su acondicionamiento, la inyección en los equipos de cromatografía líquida o de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución, el análisis e interpretación de los resultados, así como la comunicación de los informes realizados a los responsables de las muestras a analizar.
- **REALIZAR UNA PROTEÓMICA EN 240 MUESTRAS DE SUERO.** Primero, eliminar las proteínas interferentes de mayor abundancia (albúmina, IgG, IgA, transferrina, heptoglobina, antitripsina, fibrinógeno, etc.) para mejorar el posterior análisis por LC/MS y ampliar eficazmente el rango dinámico del ensayo, por ejemplo, con la tecnología Multiple Affinity Removal System (MARS) de Agilent o similar. Posteriormente, realizar una digestión de las proteínas con tripsina para obtener los péptidos. Finalmente, realizar una cuantificación relativa usando el marcaje isobárico de tipo Tandem Mass Tag (TMT), lo que permite la identificación multiplexada de proteínas, antes de una cromatografía de nano-líquidos acoplada a un espectrómetro de masas tipo Orbitrap.
- **REALIZAR UNA PROTEÓMICA EN 150 MUESTRAS DE HÍGADO.** Primero, las proteínas del tejido deben ser extraídas, precipitadas y digeridas con las enzimas tripsina/Lys-C para obtener los péptidos. Luego, se deberá realizar una cuantificación relativa usando el marcaje isobárico de tipo Tandem Mass Tag (TMT), lo que permitirá la identificación multiplexada de proteínas. Además, se propone hacer un fraccionamiento peptídico (Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation kit) por hidrofobicidad, para incrementar el espectro de proteínas a detectar. Finalmente, cada grupo de muestras fraccionadas se analizará por cromatografía de nano-líquidos de fase reversa acoplada a un espectrómetro de masas Orbitrap Velos Pro. La identificación de proteínas se deberá llevar a cabo usando el software Proteome Discoverer (ThermoFisher Scientific) o similar, combinado con el Motor de búsqueda MASCOT a partir de bases de datos humanas de Uniprot.
- El adjudicatario deberá entregar, si los responsables del proyecto así lo solicitan, un informe sobre el resultado de estos procesos de normalización y corrección de tendencia,

valorando la idoneidad de estas técnicas a los datos del proyecto. Esta posibilidad no supondrá en ningún caso incremento del coste del servicio.

- Debe aportarse la presentación de los datos y resultados de forma que sean fácilmente legibles y amigables para que los responsables del proyecto puedan seguir trabajando con ellos (ficheros Excel, tablas en formato *.csv...). Los datos deben estar disponibles para realizar análisis estadísticos y gráficos por parte de los responsables del proyecto de forma fácil e inmediata y sin restricciones. Si se necesitara algún software específico que no conlleve el uso de licencias restringidas para la visualización o tratamiento de los datos, la empresa deberá proporcionar este software sin comportar gasto adicional del servicio. La seguridad de la información debe quedar garantizada.
- Presentar un **INFORME FINAL** (en catalán, castellano o inglés) que deberá constar de: 1) un documento (Word/PDF) en el que se explicará la metodología empleada y los resultados más relevantes encontrados. 2) Una hoja de cálculo (Excel/csv) con todos los resultados de la estadística realizada y acordadas. 3) Un apéndice que contenga toda la información de las proteínas identificadas y los parámetros estadísticos de diagnóstico utilizados. En todos los casos, se debe aplicar un filtro de frecuencia y sólo aquellas proteínas que se puedan cuantificar en más del 70-80% de las muestras, en al menos uno de los grupos experimentales, se deben considerar para otros fines estadísticos que considere el grupo GEMMAIR.
- Una vez finalizado el estudio, la empresa deberá devolver el restante de las muestras a sus propietarios (Grupo GEMMAIR) en las mismas condiciones que estas se entregaron. De forma contraria, si estas no se recogen, pasados 3 meses de la finalización del estudio, las muestras deben ser destruidas ante la autorización de los propietarios de las muestras (Grupo GEMMAIR).
- Deberá asignar un responsable del servicio a efectos de todas las comunicaciones y requerimientos de la FURV.

La oferta que presente la empresa licitadora deberá abarcar la totalidad de las actividades y funciones especificadas en el presente pliego y en el Pliego de Cláusulas Particulares, siendo todas ellas obligatorias para la admisión de las propuestas.

4. Finalidades y objetivos a asumir

Las finalidades y objetivos a alcanzar mediante la realización de este contrato son los siguientes:

- Identificar, mediante la plataforma de cromatografía de nano-líquidos acoplada a un espectrómetro de masas tipo Orbitrap, y cuantificar de forma relativa, usando un marcaje isobárico de tipo Tandem Mass Tag (TMT), las proteínas y péptidos presentes en 240 muestras de suero de mujeres con obesidad mórbida y diferentes grados de afectación hepática (n = 180) y mujeres sanas con normo-peso (n = 60) como grupo control.
- Identificar, mediante la plataforma de cromatografía de nano-líquidos de fase reversa acoplada a un espectrómetro de masas Orbitrap Velos Pro, y cuantificar de forma relativa, usando un marcaje isobárico de tipo Tandem Mass Tag (TMT), las proteínas y péptidos

presentes en 150 muestras de hígado de mujeres con obesidad mórbida y diferentes grados de afectación hepática.

- Definir el perfil proteómico en muestras de suero y en hígado de los diferentes grupos de estudio.
- Identificar, mediante el análisis de datos, que proteínas o péptidos son diferenciales y determine en una población de mujeres con EHNA y obesidad mórbida asociada.
- Definir cuáles son los potenciales biomarcadores no invasivos de carácter peptídico/proteico adecuados para el diagnóstico de la EHNA en una cohorte de mujeres con obesidad mórbida.

5. Requerimientos técnicos generales obligatorios de la prestación y/o rendimiento o exigencias funcionales de la prestación

La empresa contratista dispondrá de los medios técnicos, materiales cualitativos y personales suficientes para desarrollar las tareas objeto de este contrato.

La prestación regulada en el presente pliego deberá ajustarse, al menos, a los siguientes requisitos técnicos, sin perjuicio de los parámetros a valorar mediante los criterios de adjudicación establecidos:

- Disponer de una plataforma que combine cromatografía líquida con espectrometría de masa (LC-MS), así como un espectrómetro de masas de alta resolución de tipo Orbitrap para la identificación y cuantificación relativa de proteínas usando marcaje isobárico de tipo Tandem Mass Tag (TMT).
- Disponer de espacio para el almacenado de muestras y reactivos a diferentes temperaturas (4°C, -20°C, -80°C y -96°C), además de tanque de N₂ líquido.
- Disponer o tener acceso a reactivos y tecnologías necesarios para el correcto análisis proteómico de las muestras (Affinity Removal System (MARS) de Agilent o similar, enzimas tripsina/Lys-C, Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation kit o afines).
- Disponer de acceso a softwares específicos para la identificación de las proteínas como el software Proteome Discoverer (ThermoFisher Scientific) o similares, o el motor de búsqueda MASCOT, además de tener personal familiarizado y experto en su uso.
- Ser capaz de aplicar diferentes procesos de normalización a los datos obtenidos por cromatografía líquida con espectrometría de masas, haciendo equiparables los diferentes ensayos realizados con todas las muestras analizadas. Es condición indispensable aplicar técnicas de normalización de los datos observados para evitar sesgo intra e inter ensayos.
- Poseer personal cualificado en las técnicas contratadas (proteómica), el análisis de datos y en la comunicación con el cliente.

- Se valorará positivamente la posibilidad de acceso a las instalaciones por parte de un miembro experimentado del IISPV para participar, a modo de auto-usuario, en la preparación de muestras y la adquisición de datos.

En términos de rendimiento o de exigencias funcionales, las prestaciones de este contrato tendrán que alcanzar los siguientes hitos:

- El plazo de realización del servicio por parte del adjudicatario no podrá exceder de 6 meses a contar desde la formalización del contrato o la que figure en este. Este plazo incluirá todos los servicios necesarios para la realización completa de las tareas definidas en este Pliego, que incluyen de forma enunciativa y no limitativa, extracciones, obtención del perfil proteómico, tratamiento estadístico, análisis de datos e informe final.
- Cualquier empresa licitadora que presente propuesta, se presume que ofrece el servicio íntegro explicado en el Pliego, sin limitaciones posteriores al acceso y tratamiento de los datos derivados del servicio. A nivel enunciativo no limitativo, no se podrá cobrar a la FURV con posterioridad a la adjudicación importe alguno por licencias, accesos, informes, etc. derivados del análisis de las muestras objeto de contratación.

6. Formas de seguimiento y control de la ejecución de las condiciones

El órgano de contratación designará a una persona que asumirá el control y la coordinación de la ejecución contractual con la empresa contratista a fin de tratar directamente las cuestiones relacionadas con el desarrollo normal de las tareas indicadas en este pliego.

La empresa contratista debe designar a una persona responsable a quien encargar la gestión de la ejecución del contrato y que deberá garantizar la calidad de la prestación objeto de este pliego, tratando directamente las cuestiones relacionadas con el desarrollo normal de las tareas indicadas en este pliego con la persona interlocutora designada por el órgano de contratación.

Las personas referidas anteriormente se reunirán con una periodicidad mínima de **1 mes** para supervisar, controlar y tratar cualquier aspecto vinculado con el desarrollo del contrato, a fin de asegurar que el mismo se está ejecutado conforme a lo establecido en el presente pliego.

A los efectos anteriores, se evaluará el seguimiento y control del cumplimiento de cada requerimiento técnico de la siguiente manera:

- Antes de empezar el estudio, la empresa contratista deberá aportar un informe detallado de los métodos y técnicas que usará para realizar el servicio, las cuáles deben adaptarse a los requerimientos de este Pliego.
- Mantener una comunicación continuada en hilo de mensajes entre la/s persona/s responsable/s del proyecto en la empresa contratista y la/s persona/s responsable/s del proyecto de la FURV siempre mediante correo electrónico.



- Establecer un calendario donde concretar: recepción de muestras, inicio del análisis, comunicación intermedia, final del análisis experimental, inicio del análisis de datos, envío del informe final y reunión final del estudio.
- Concretar y agendar al menos 3 reuniones mediante la plataforma Microsoft Teams durante el estudio: 1) Antes de empezar, para concretar el calendario y resolver dudas previas, 2) En mitad del estudio, para comentar los avances, las posibles interferencias y como solventarlas, 3) Al final del estudio, para discutir resultados y resolver dudas posteriores.
- Debe haber transparencia en la comunicación entre la empresa contratista y las personas responsables del proyecto del grupo GEMMAIR ante cualquier duda, requerimiento o inconveniente.