Universidad Europea

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Máster Universitario en Biotecnología Clínica



CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES INMUNOMETABÓLICOS ASOCIADOS AL RIESGO DE PROGRESIÓN EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO SIN RESPUESTA PATOLÓGICA COMPLETA TRAS QUIMIOINMUNOTERAPIA NEOADYUVANTE

Autor: Rebeca Alfonso Cuesta
Tutor: Alberto Cruz Bermúdez

Villaviciosa de Odón, 6 de Julio 2026

ÍNDICE

Agradecimientos **3**

Resumen **4**

Abstract **4**

Introducción **5**

Objetivos **9**

Justificación del estudio 9

Objetivo general 10

Objetivos específicos 10

Materiales y Métodos **10**

Diseño del estudio 11

Pacientes y muestras 11

Procesamiento de muestras 12

Inmunohistoquímica de Linfocitos T CD8+ 12

Puesta a punto de inmunohistoquímica de proteínas metabólicas: TOMM20, MT-CO1 y TYMS 13

Inmunohistoquímica de proteínas metabólicas 14

Evaluación inmunohistoquímica 15

Análisis estadístico 15

Uso de herramientas de Inteligencia artificial 16

Resultados **16**

Infiltración inmunitaria tumoral: Linfocitos T CD8+ 17

Reprogramación metabólica tumoral: GLUT1, GLS y Ki-67 21

Discusión **26**

Conclusiones **30**

Bibliografía **32**

Anexos **37**

Anexo I: Características de los anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica. 37

Anexo II: Diseño experimental para la optimización inmunohistoquímica de TOMM20, MT-CO1 y TYMS 37

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todas las personas que me han acompañado durante este año y que, de una forma u otra, han contribuido a que este Trabajo Fin de Máster haya salido adelante.

A mi familia y a mi pareja, por ser mi mayor apoyo durante este año. Gracias por vuestra paciencia, por entender mis ausencias, mis nervios y mis momentos de agobio, y por estar siempre a mi lado. Gracias por confiar en mí incluso cuando yo misma dudaba. Este trabajo también es vuestro.

A Claudia y David, directores del Máster, por haber confiado en mí desde el primer momento. Gracias por vuestro apoyo, por vuestra cercanía y por ayudarme siempre que lo he necesitado. Haber contado con vosotros durante este año ha sido un auténtico privilegio.

A Alberto, por darme la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Máster. Gracias por la confianza, por el tiempo que me has dedicado y por todo lo que me has enseñado durante estos meses. Gracias también por tu apoyo y por hacer que todo fuera un poco más fácil.

A Marta, porque sin ti este trabajo no habría salido adelante. Gracias por tu paciencia, por dedicarme tantísimo tiempo, por enseñarme, por responder a cada una de mis dudas y por acompañarme en cada etapa de este proyecto. Este trabajo lleva también tu esfuerzo, y siempre te estaré agradecida por ello.

A Dani, por haberme acompañado durante todo este camino. Gracias por escucharme cuando las cosas no salían bien, por aconsejarme cuando lo necesitaba y por soportar con paciencia mis momentos de estrés.

A Juanma, Ángeles y Cris, por todo lo que me habéis enseñado y por toda la ayuda que me habéis brindado durante este tiempo. Gracias por vuestra paciencia, por resolver mis dudas y por hacerme sentir una más desde el primer día.

Y, por último, quiero darme las gracias a mí misma. Porque este ha sido, sin duda, un año muy difícil, tanto en lo académico como en lo personal. Ha habido momentos en los que pensé que no sería capaz, pero seguí adelante. Hoy puedo decir que todo el esfuerzo ha merecido la pena y que, pese a las dificultades, lo he logrado.

Resumen

El cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) presenta una elevada heterogeneidad en cuanto a la supervivencia tras quimioinmunoterapia neoadyuvante, especialmente en los pacientes que no alcanzan una respuesta patológica completa (non-pCR), para los que existen escasos biomarcadores pronósticos validados. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre la infiltración por linfocitos T CD8+ y la expresión de los biomarcadores metabólicos GLUT1, GLS y Ki-67 con la progresión de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con NSCLC non-pCR. Se realizó un estudio observacional retrospectivo en una cohorte de pacientes tratados con quimioinmunoterapia neoadyuvante seguida de cirugía. La infiltración por linfocitos T CD8+ y la expresión de los biomarcadores se evaluaron mediante inmunohistoquímica, utilizando QuPath para la cuantificación automatizada del infiltrado inmunitario. Un mayor porcentaje de infiltración por linfocitos T CD8+ se asoció con una mayor supervivencia global, mientras que la densidad del infiltrado y la expresión de GLUT1, GLS y Ki-67 no mostraron asociación con la progresión ni con la supervivencia. Estos resultados sugieren que el porcentaje de infiltración por linfocitos T CD8+ podría constituir un biomarcador pronóstico de interés en pacientes con NSCLC non-pCR, cuya utilidad deberá confirmarse en estudios multicéntricos de mayor tamaño.

Palabras clave: cáncer de pulmón no microcítico; quimioinmunoterapia neoadyuvante; linfocitos T CD8+; inmunohistoquímica; biomarcadores pronósticos.

Abstract

Non-small cell lung cancer (NSCLC) exhibits considerable heterogeneity in survival outcomes after neoadjuvant chemoimmunotherapy,, particularly among patients who do not achieve a pathological complete response (non-pCR), for whom few validated prognostic biomarkers are currently available. This study aimed to evaluate the association between CD8+ T-cell infiltration and the expression of the metabolic biomarkers GLUT1, GLS, and Ki-67 with disease progression and survival in patients with non-pCR NSCLC. A retrospective observational study was conducted in a cohort of patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy followed by surgical resection. CD8+ T-cell infiltration and biomarker expression were assessed by immunohistochemistry, while immune infiltration was quantified using QuPath digital pathology software. A higher percentage of CD8+ T-cell infiltration was associated with improved overall survival, whereas CD8+ cell density and the expression of GLUT1, GLS, and Ki-67 showed no association with disease progression or survival outcomes. These findings suggest that the percentage of CD8+ T-cell infiltration may represent a promising prognostic biomarker in patients with non-pCR NSCLC. However, its clinical utility should be confirmed in larger multicenter studies.

Keywords: non-small cell lung cancer; neoadjuvant chemoimmunotherapy; CD8+ T cells; immunohistochemistry; prognostic biomarkers.

Introducción

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo. Cada año se diagnostican más de 2,5 millones de nuevos casos y se producen aproximadamente 1,8 millones de fallecimientos, lo que pone de manifiesto el importante impacto sanitario y socioeconómico de esta enfermedad (Smolarz et al., 2025). En España, el cáncer de pulmón también presenta una elevada incidencia y mortalidad y se sitúa entre los tumores más frecuentes en ambos sexos (SEOM, 2025).

Histológicamente, el cáncer de pulmón se clasifica en dos grandes grupos: el cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, del inglés *small cell lung cancer*) y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, del inglés *non-small cell lung cancer*), representando este último aproximadamente el 85% de los casos (Nicholson et al., 2022; World Health Organization, 2021). Dentro del NSCLC se incluyen principalmente el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso y el carcinoma de células grandes, siendo el adenocarcinoma el subtipo más prevalente en la actualidad, representando aproximadamente el 40–50% de los casos, seguido del carcinoma escamoso (20–30%) y del carcinoma de células grandes (10–15%) (Thai et al., 2021).

A pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos, la supervivencia global continúa siendo limitada. En el momento del diagnóstico, alrededor del 45 % de los pacientes presenta enfermedad metastásica (estadio IV), mientras que entre un 20 y un 35 % se diagnostica en estadio III (localmente avanzado), lo que implica que cerca de dos tercios de los casos se identifican en estadios avanzados (Casal-Mouriño et al., 2021; Centers for Disease Control and Prevention, 2025). En este contexto, el estadio III representa un grupo especialmente relevante, no solo por su elevada frecuencia, sino también por su marcada heterogeneidad clínica y biológica, lo que condiciona importantes diferencias en el pronóstico y la respuesta terapéutica (Casal-Mouriño et al., 2021).

En pacientes con NSCLC resecable, el tratamiento sistémico puede administrarse en diferentes momentos del abordaje quirúrgico. La terapia neoadyuvante se administra antes de la cirugía para reducir la carga tumoral, eliminar micrometástasis y facilitar la resección quirúrgica. Por el contrario, la terapia adyuvante se emplea tras la cirugía para disminuir el riesgo de recaída (Xu et al., 2023). En los últimos años se ha incorporado el concepto de tratamiento perioperatorio que combina estrategias neoadyuvantes y adyuvantes, integrando inmunoterapia antes y después de la cirugía para maximizar el beneficio clínico (DeVita et al., 2023).

La incorporación de la inmunoterapia basada en inhibidores de puntos de control inmunitario (ICIs, del inglés *immune checkpoint inhibitors*) ha transformado el tratamiento

perioperatorio del NSCLC resecable, mejorando los resultados clínicos en pacientes candidatos a cirugía (Hegde & Chen, 2020).

En este contexto, el eje PD-1/PD-L1 (del inglés, *programmed cell death protein 1 / programmed death-ligand 1*) constituye uno de los principales mecanismos de regulación negativa de la respuesta inmunitaria. El receptor PD-1, expresado en linfocitos T activados, interactúa con su ligando PD-L1, presente en células tumorales y en el microambiente tumoral, inhibiendo la activación y la función de los linfocitos T y favoreciendo la evasión inmunitaria (Sharma et al., 2017). Así pues, la expresión de PD-L1 se ha consolidado como el biomarcador clínico más ampliamente utilizado para la selección de pacientes candidatos a inmunoterapia en NSCLC. Sin embargo, su valor predictivo es limitado, ya que presenta una elevada heterogeneidad espacial y temporal, así como variabilidad metodológica en su determinación, por lo que la correlación entre su expresión y la respuesta clínica sigue siendo limitada (Stinchcombe, 2023).

Entre los inhibidores del eje PD-1/PD-L1, nivolumab, un anticuerpo monoclonal dirigido frente a PD-1, ha demostrado eficacia clínica en diferentes escenarios del NSCLC, tanto en enfermedad avanzada como en estadios resecables en contexto neoadyuvante (Brahmer et al., 2015; Forde et al., 2022). En particular, su uso en combinación con quimioterapia en el contexto neoadyuvante en pacientes con enfermedad localmente avanzada potencialmente resecable ha mostrado una mejora significativa en las tasas de respuesta patológica completa. Además, se ha asociado a mejores resultados en supervivencia, consolidando su papel en el tratamiento multimodal del NSCLC (Provencio et al., 2020; Provencio et al., 2023).

La respuesta al tratamiento en este contexto se evalúa mediante parámetros histopatológicos como la respuesta patológica completa (pCR, del inglés *pathological complete response*), la respuesta patológica mayor (MPR, del inglés *major pathological response*) y la enfermedad residual o ausencia de respuesta patológica completa (non-pCR, del inglés *non-pathological complete response*), los cuales se han consolidado como indicadores relevantes de pronóstico en pacientes con NSCLC tratados con quimioinmunoterapia (Forde et al., 2022; Provencio et al., 2024).

En este marco se desarrollan ensayos clínicos como NADIM I (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03081689) y NADIM II (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03838159), que evaluaron la eficacia de la combinación de quimioterapia basada en platino junto con nivolumab en pacientes con NSCLC resecable en estadios IIIA. Estos estudios demostraron tasas elevadas de pCR y una mejora significativa en la supervivencia libre de progresión y global. (Provencio et al., 2023; Provencio et al., 2024) Actualmente, se está desarrollando el estudio Real NADIM, con el objetivo de evaluar la efectividad y seguridad de este abordaje en condiciones de práctica

clínica real (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05382052). Este estudio permitirá validar los resultados obtenidos en ensayos clínicos controlados en una cohorte más representativa de la práctica asistencial.

A pesar de los resultados prometedores, un porcentaje significativo de pacientes no alcanza una respuesta patológica completa. Los pacientes con non-pCR constituyen un grupo clínicamente heterogéneo, pues algunos pacientes mantienen un buen control de la enfermedad tras el tratamiento, mientras que otros desarrollan una progresión tumoral precoz, asociada a un peor pronóstico (Provencio et al., 2024). Actualmente no existen biomarcadores robustos que permitan identificar qué pacientes presentan un mayor riesgo de recaída tras el tratamiento perioperatorio, lo que dificulta la toma de decisiones respecto a la necesidad de estrategias terapéuticas adyuvantes adicionales. Todo ello indica que existen mecanismos biológicos aún no completamente conocidos que influyen tanto en la respuesta al tratamiento como en la evolución clínica de la enfermedad.

La resistencia a la quimioinmunoterapia es un fenómeno complejo que implica tanto mecanismos intrínsecos de las células tumorales como factores relacionados con el microambiente tumoral (Sharma et al., 2017).

Dentro del microambiente tumoral, los linfocitos T (LT) CD8+ citotóxicos desempeñan un papel fundamental en la respuesta antitumoral mediada por el sistema inmune, ya que reconocen y eliminan las células tumorales (Farhood et al., 2018). La infiltración tumoral por linfocitos CD8+ se ha asociado con una mayor actividad inmunológica intratumoral y con una respuesta más favorable a los inhibidores de puntos de control inmunitario en distintos tipos tumorales, incluido el NSCLC (Farhood et al., 2018; Brambilla et al., 2016). Además, varios estudios han relacionado una elevada densidad de linfocitos T CD8+ infiltrantes con un mejor pronóstico clínico y una mayor supervivencia en pacientes con NSCLC (Brambilla et al., 2016).

Sin embargo, la interacción entre el infiltrado inmunitario y las células tumorales es altamente compleja y dinámica. La eficacia de la respuesta inmunitaria antitumoral puede verse condicionada por distintos mecanismos de inmunosupresión presentes en el microambiente tumoral, incluyendo alteraciones metabólicas, hipoxia, producción de lactato y competencia por nutrientes esenciales, factores que pueden limitar la activación y funcionalidad de los linfocitos T CD8+ (Faubert et al., 2020). Por ello, la cuantificación de linfocitos T CD8+ ha cobrado interés como posible biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta terapéutica en pacientes tratados con inmunoterapia.

Por otro lado, ha cobrado especial relevancia el papel de la reprogramación metabólica tumoral como mecanismo clave en la progresión tumoral, la resistencia al tratamiento y la modulación del microambiente inmunológico (Faubert et al., 2020).

Las células tumorales poseen una elevada plasticidad metabólica que les permite adaptarse a condiciones adversas, como la hipoxia o la presión terapéutica, favoreciendo su supervivencia y proliferación (Faubert et al., 2020). Una de las adaptaciones metabólicas más conocidas es el efecto Warburg, caracterizado por la utilización preferente de la glucólisis aeróbica incluso en presencia de oxígeno (Cruz-Bermudez et al., 2017). Este cambio metabólico favorece la producción de lactato y la generación de un microambiente inmunosupresor (Martínez-Reyes & Chandel, 2021). En este contexto, el transportador de glucosa 1 (GLUT1, del inglés *glucose transporter 1*) se encuentra frecuentemente sobreexpresado en NSCLC y se asocia a un aumento de la captación de glucosa y a un fenotipo tumoral más agresivo (Guo et al., 2020; Park et al., 2023).

La fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *oxidative phosphorylation*) continúa desempeñando un papel relevante en determinadas subpoblaciones tumorales, especialmente aquellas asociadas a mayor resistencia terapéutica (Cruz-Bermudez et al., 2019). A través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, esta vía genera ATP y contribuye al mantenimiento del equilibrio redox, favoreciendo la adaptación de las células tumorales a condiciones de estrés. Entre las proteínas relacionadas con la función mitocondrial destaca TOMM20 (*translocase of the outer mitochondrial membrane 20*, del inglés), implicada en la importación de proteínas a la mitocondria y que se utiliza como marcador de masa y actividad mitocondrial, habiéndose relacionado su sobreexpresión con una mayor capacidad metabólica y adaptación tumoral a condiciones de estrés (Islam et al., 2025). Por su parte, MT-CO1 (*mitochondrially encoded cytochrome c oxidase 1,* del inglés), subunidad del complejo IV de la cadena de transporte de electrones, refleja la actividad de la fosforilación oxidativa y se ha asociado a la producción de energía mitocondrial y a la adaptación metabólica de las células tumorales en condiciones de estrés (Singh et al., 2019).

La glutaminólisis representa otra vía metabólica esencial para el crecimiento tumoral, especialmente en contextos donde la disponibilidad de otros nutrientes es limitada (Martínez-Reyes & Chandel, 2021). La glutaminasa (GLS, del inglés *glutaminase*), enzima clave en esta vía, cataliza la conversión de glutamina en glutamato y permite su entrada en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, del inglés t*ricarboxylic acid cycle*), contribuyendo tanto a la producción de energía como a la síntesis de macromoléculas. Además de su función energética, la glutaminólisis contribuye al mantenimiento del equilibrio redox mediante la síntesis de glutatión. Por ello, la sobreexpresión de GLS se ha asociado a un aumento de la proliferación tumoral, a la adaptación

metabólica frente a condiciones de estrés y a la resistencia a tratamientos antitumorales (Li et al., 2025).

La biosíntesis de nucleótidos también es un proceso esencial para la proliferación celular, especialmente en tumores con alta tasa replicativa (Faubert et al., 2020). En esta vía, la timidilato sintasa (TYMS, del inglés *thymidylate synthase*) desempeña un papel clave en la síntesis de timidina, necesaria para la replicación y reparación del ADN (Chamizo et al., 2015). Su sobreexpresión se ha relacionado con un aumento de la proliferación tumoral y con resistencia al tratamiento (Geng, 2024)

Finalmente, la proliferación celular puede evaluarse mediante Ki-67, un marcador nuclear ampliamente utilizado que refleja la fracción de células en ciclo activo. Una elevada expresión de Ki-67 se asocia con un mayor índice proliferativo, un comportamiento tumoral más agresivo y un peor pronóstico en pacientes con NSCLC (Wang et al., 2021).

En conjunto, la evidencia actual sugiere que la reprogramación metabólica desempeña un papel central en la progresión tumoral y en la respuesta a la quimioinmunoterapia en pacientes con NSCLC. La interacción entre las diferentes rutas metabólicas y el microambiente tumoral refleja la complejidad biológica de esta enfermedad, lo que pone de manifiesto la necesidad de una mejor caracterización de los mecanismos implicados en la resistencia terapéutica. Profundizar en los mecanismos metabólicos implicados en la resistencia tumoral podría permitir la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos útiles para estratificar el riesgo de recaída en pacientes con NSCLC tratados con quimioinmunoterapia perioperatoria. Esto podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas más personalizadas y orientar futuras decisiones sobre la necesidad de tratamiento adyuvante tras la cirugía.

Objetivos

Justificación del estudio

A pesar de los avances en el tratamiento del NSCLC, un porcentaje significativo de pacientes tratados con quimioinmunoterapia neoadyuvante no alcanza una respuesta patológica completa. En este contexto, la pCR se ha consolidado como un marcador subrogado de buen pronóstico y se asocia a mejores resultados clínicos y menor riesgo de recaída. Sin embargo, los pacientes con non-pCR presentan una evolución clínica heterogénea, de manera que mientras algunos mantienen control de la enfermedad a largo plazo, otros desarrollan progresión tumoral precoz.

Resultados previos del grupo sugieren que, en estos pacientes, los tumores presentan una sobreexpresión de determinadas rutas metabólicas, lo que podría reflejar un fenotipo tumoral más agresivo y adaptado a la presión terapéutica. En este contexto, la reprogramación metabólica podría desempeñar un papel relevante en la progresión tumoral y en la resistencia al tratamiento.

Por otro lado, el microambiente inmunológico tumoral también podría influir en la evolución clínica de estos pacientes. En particular, la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ se ha asociado con la respuesta inmunitaria antitumoral y con diferencias pronósticas en pacientes con NSCLC, por lo que su evaluación podría aportar información adicional sobre posibles mecanismos relacionados con la progresión tumoral.

Por ello, resulta de interés analizar la expresión de biomarcadores asociados a rutas metabólicas junto con la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+, con el objetivo de comparar su expresión entre pacientes non-pCR que progresan y aquellos que no progresan, y explorar su posible valor como biomarcadores pronósticos y predictivos de progresión tumoral.

Objetivo general

Evaluar mediante inmunohistoquímica la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ y la expresión de proteínas relacionadas con procesos metabólicos en áreas tumorales residuales de tumores de NSCLC que no han alcanzado una respuesta patológica completa tras el tratamiento con quimioinmunoterapia, con el fin de identificar biomarcadores asociados al riesgo de progresión tumoral.

Objetivos específicos

1. Analizar la infiltración de linfocitos T CD8+ y la expresión de un panel de proteínas metabólicas en muestras tumorales de pacientes con NSCLC non-pCR mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHC).

2. Comparar la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ y los niveles de expresión de dichas proteínas entre pacientes que presentan progresión de la enfermedad y aquellos que no progresan tras alcanzar respuesta patológica no completa.

3. Determinar qué proteínas o patrones de expresión pueden actuar como predictores de progresión en pacientes con respuesta no completa tras neoadyuvancia.

4. Evaluar la asociación entre los biomarcadores significantes y variables clínicas relevantes.

Materiales y Métodos

La **Figura 1** resume de forma esquemática el flujo de trabajo seguido en este estudio, mostrando las principales fases del diseño experimental, desde la selección de los pacientes y el procesamiento de las muestras hasta la evaluación inmunohistoquímica y el análisis estadístico.



Figura 1. Esquema general de la metodología del estudio. Representación gráfica del diseño metodológico seguido en este trabajo, incluyendo la selección de la cohorte de pacientes, el procesamiento de muestras FFPE, la evaluación inmunohistoquímica de los biomarcadores inmunológicos y metabólicos, y los análisis estadísticos realizados para estudiar su asociación con la progresión tumoral y la supervivencia. Fuente: Elaboración propia mediante ChatGPT (OpenAI).

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional retrospectivo de carácter traslacional en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico tratados con quimioinmunoterapia neoadyuvante seguida de cirugía. El estudio incluyó exclusivamente pacientes que no alcanzaron una respuesta patológica completa, con el objetivo de identificar biomarcadores asociados al riesgo de progresión tumoral. Para ello, se evaluó mediante inmunohistoquímica tanto la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ como la expresión de proteínas relacionadas con la reprogramación metabólica tumoral, analizándose su posible asociación con la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

Pacientes y muestras

En el estudio se incluyeron muestras de pacientes diagnosticados de NSCLC resecable tratados con quimioinmunoterapia neoadyuvante seguida de resección quirúrgica. Para el análisis de biomarcadores metabólicos se incluyeron un total de 28 muestras correspondientes a 3 pacientes del ensayo clínico NADIM I (NCT03081689), 13 pacientes del ensayo NADIM II (NCT03838159) y 12 pacientes del estudio Real NADIM (NCT05382052). Asimismo, para el análisis de la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ se incluyeron 14 muestras adicionales procedentes de pacientes del estudio NADIM I (NCT03081689).

Los pacientes recibieron tratamiento neoadyuvante basado en quimioinmunoterapia con platino en combinación con nivolumab durante tres ciclos, seguido de cirugía con intención curativa, de acuerdo con los protocolos establecidos en cada estudio. Posteriormente, los pacientes candidatos recibieron tratamiento adyuvante con nivolumab según protocolo.

Tras la resección quirúrgica, la respuesta patológica fue evaluada por el Servicio de Anatomía Patológica mediante la determinación del porcentaje de tumor viable residual presente en la pieza quirúrgica. La respuesta patológica completa se definió como ausencia de células tumorales viables, mientras que la respuesta patológica mayor se estableció como ≤10% de tumor viable residual. Los pacientes que no alcanzaron una respuesta patológica completa o mayor fueron clasificados como non-pCR. Posteriormente, las muestras tumorales fueron procesadas de forma rutinaria y conservadas en bloques de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE, del inglés *formalin-fixed paraffin-embedded*).

Para el presente estudio se seleccionaron exclusivamente pacientes pertenecientes al grupo non-pCR, incluyéndose únicamente aquellos casos con tejido tumoral residual suficiente y adecuado para el análisis inmunohistoquímico.

Procesamiento de muestras

A partir de los bloques FFPE se realizaron cortes seriados de 4 µm de espesor utilizando un micrótomo rotatorio. Previamente al corte, los bloques fueron refrigerados sobre hielo para favorecer la integridad del tejido y mejorar la calidad de las secciones. Los cortes obtenidos fueron extendidos sobre un baño de agua ultrapura a 40–45 °C y posteriormente montados sobre portaobjetos adhesivos (631-0108, Thermo Fisher Scientific).

Las muestras fueron secadas durante toda la noche a 37 °C para favorecer la adhesión tisular al portaobjetos. Las áreas tumorales fueron seleccionadas y revisadas previamente para garantizar la presencia de tejido tumoral viable suficiente para el análisis.

Inmunohistoquímica de Linfocitos T CD8+

La inmunotinción para la detección de linfocitos T CD8+ se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda mediante técnicas inmunohistoquímicas estandarizadas, empleando anticuerpos validados y utilizados de forma rutinaria en el diagnóstico anatomopatológico. Todos los procedimientos se realizaron conforme a los protocolos internos y controles de calidad del laboratorio. Posteriormente, los portaobjetos fueron digitalizados mediante escáner de alta resolución en el Servicio de Anatomía Patológica de la Fundación Jiménez Díaz para su posterior análisis y cuantificación.

Puesta a punto de inmunohistoquímica de proteínas metabólicas: TOMM20, MT-CO1 y TYMS

Los biomarcadores TOMM20, MT-CO1 y TYMS, cuyos anticuerpos son considerados anticuerpos de investigación, requirieron una fase específica de puesta a punto y optimización experimental previa a su análisis definitivo, con el objetivo de establecer las condiciones experimentales que proporcionasen la mejor relación señal/fondo para cada biomarcador analizado.

Se emplearon anticuerpos primarios monoclonales específicos frente a cada diana: para TOMM20 Anti-TOMM20 antibody [EPR15581-54] – Mitochondrial Marker (ab186735, Abcam), para MT-CO1 Anti-MTCO1 antibody [1D6E1A8] (ab14705) y para TYMS Anti-Thymidylate Synthase antibody [EPR4545] (Ab108995).

Por otro lado, para TOMM20 y TYMS se utilizó el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed (ab7090, Abcam), mientras que para MT-CO1 se empleó Goat Anti-Mouse IgG2a heavy chain (HRP) preadsorbed (ab98698, Abcam). Las características y referencias de los anticuerpos primarios y secundarios empleados se resumen en la **Tabla A1** del **Anexo I**.

La optimización experimental se diseñó mediante un esquema 3×3 (**Figura A1, Anexo II**), evaluándose tres diluciones diferentes del anticuerpo primario combinadas con tres diluciones distintas del anticuerpo secundario para cada biomarcador. Este diseño permitió analizar múltiples condiciones experimentales y determinar la combinación óptima en términos de intensidad de señal específica y reducción del fondo inespecífico.

Para TOMM20 y TYMS se evaluaron diluciones del anticuerpo primario de 1/50, 1/100 y 1/200, combinadas con diluciones del anticuerpo secundario de 1/150, 1/300 y 1/600. En el caso de MT-CO1 se analizaron diluciones del anticuerpo primario de 1/250, 1/500 y 1/1000, junto con diluciones del anticuerpo secundario de 1/200, 1/1000 y 1/2000.

La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda, con el objetivo de favorecer un equilibrio más completo entre antígeno y anticuerpo, permitiendo trabajar con diluciones más elevadas y reduciendo el fondo inespecífico.

Asimismo, se incluyeron controles negativos específicos para evaluar posibles tinciones inespecíficas derivadas del anticuerpo secundario o de la actividad de peroxidasa endógena.

La evaluación de los resultados se realizó considerando la intensidad de la señal, la localización subcelular esperada y la ausencia de tinción inespecífica en los controles negativos.

Se seleccionarán finalmente aquellas condiciones que proporcionaron una señal específica nítida con el menor fondo posible y un consumo optimizado de reactivos.

Inmunohistoquímica de proteínas metabólicas

Debido a la disponibilidad de anticuerpos previamente validados en práctica asistencial rutinaria por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, los biomarcadores GLUT1, GLS y Ki-67 fueron analizados mediante protocolos inmunohistoquímicos estandarizados realizados en dicho servicio. Por su parte, las tinciones correspondientes a TOMM20, MT-CO1 y TYMS fueron realizadas manualmente siguiendo el protocolo experimental optimizado descrito previamente.

Las muestras FFPE fueron sometidas a un proceso de desparafinización mediante incubaciones sucesivas en xileno y concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 85%, 75%) hasta alcanzar la rehidratación completa del tejido.

Posteriormente, se realizó recuperación antigénica inducida por calor (HIER, del inglés *heat-induced epitope retrieval*). Para MT-CO1 se utilizó buffer citrato pH 6.0 (ab64236, Abcam), mientras que para TOMM20 y TYMS se empleó buffer Tris-EDTA pH 9.0 ab93684, Abcam). Los portaobjetos fueron calentados en microondas hasta ebullición y mantenidos durante 10 minutos, seguidos de un periodo de enfriamiento gradual.

Tras la recuperación antigénica, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena, mediante una solución de peróxido de hidrógeno al 3% (ab64218, Abcam) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se efectuó un bloqueo inespecífico utilizando una solución de bloqueo con 1% de BSA (ab64009, Abcam). en cámara húmeda.

Las muestras fueron incubadas toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos frente a TOMM20, MT-CO1 y TYMS, preparados en TBS (ab64248, Abcam) +Tween-20 (P1379-100ML, Merck) suplementado con 1% de BSA. Tras lavados seriados con TBST (TBS+Tween-20), se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La detección inmunohistoquímica se realizó mediante el sistema cromogénico DAB (3,3'-diaminobencidina) (ab64009, Abcam), monitorizando el desarrollo de la señal microscópicamente hasta obtener la intensidad deseada. Posteriormente, las muestras fueron contratintadas con hematoxilina (255298.1610, PanReac AppliChem ITW Reagents), deshidratadas mediante incubaciones seriadas en alcoholes (75%, 95%, 100%) y xileno y finalmente montadas con medio de montaje permanente DPX (255254.1610, PanReac AppliChem ITW Reagents).

Evaluación inmunohistoquímica

Los portaobjetos de los Linfocitos T CD8+ sometidos a tinción inmunohistoquímica fueron escaneados mediante el microscopio Wide Field Thunder (Leica Microsystems) utilizando un aumento de 20× y una cámara microscópica CMOS K5, permitiendo el análisis digital de las imágenes obtenidas.

La cuantificación se realizó mediante el software QuPath versión 0.7.0-arm64 (Bankhead et al., 2017). Previamente, se seleccionaron las áreas tumorales viables para el análisis, excluyendo regiones necróticas, artefactadas o no representativas. La detección de células positivas y negativas se llevó a cabo de forma automatizada, identificando los linfocitos T citotóxicos mediante tinción predominantemente membranosa. A partir de este análisis se obtuvieron dos variables: el porcentaje de linfocitos T CD8+, definido como el número de linfocitos T CD8+ positivos respecto al total de células identificadas en el área analizada, y la densidad de linfocitos T CD8+, expresada como el número de linfocitos T CD8+ positivos por milímetro cuadrado (células/mm²). Estas variables fueron empleadas para los análisis estadísticos posteriores.

La expresión de GLUT1, GLS, Ki-67, se evaluó mediante análisis visual semicuantitativo utilizando microscopía óptica con un aumento de 20×. Cada corte fue revisado de forma independiente por dos observadores, quienes desconocían las valoraciones realizadas por el otro evaluador. La intensidad de tinción se clasificó en dos categorías: baja o alta. La evaluación se realizó considerando la localización subcelular característica de cada biomarcador: membranosa para GLUT1, nuclear para Ki-67 y citoplasmática con patrón mitocondrial para GLS

Posteriormente, se compararon las evaluaciones de ambos observadores y, en los casos en los que existieron discrepancias, las muestras fueron reevaluadas conjuntamente hasta alcanzar un consenso.

Una vez finalizada la puesta a punto de los protocolos de inmunohistoquímica para TOMM20, MT-CO1 y TYMS, la evaluación de estos biomarcadores se realizará siguiendo la misma metodología descrita para GLUT1, GLS y Ki-67, mediante análisis visual semicuantitativo por dos observadores independientes, con resolución de las discrepancias por consenso y teniendo en cuenta la intensidad de la tinción y la localización subcelular característica de cada proteína.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics (versión 32; IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.).

Las variables cualitativas se describieron mediante frecuencias absolutas y relativas [n (%)], mientras que las variables cuantitativas se representaron mediante diagramas de caja y bigotes, mostrando la mediana, el rango intercuartílico y los valores extremos.

La asociación entre el estado de progresión (no progresados y progresados) y la infiltración de linfocitos T CD8+, expresada como porcentaje de infiltración y densidad celular (células/mm²), se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U, al tratarse de variables continuas. Este mismo análisis se empleó para estudiar la relación entre el porcentaje de infiltración de LT CD8+ y las variables clinicopatológicas (sexo, subtipo histológico y estado tabáquico).

Para los análisis de asociación y supervivencia, la infiltración de LT CD8+, expresada como porcentaje de infiltración y densidad celular, se clasificaron en categorías de alta y baja utilizando la mediana como punto de corte. En el caso de los biomarcadores de reprogramación metabólica (GLUT1, GLS y Ki-67), la expresión inmunohistoquímica se clasificó como alta o baja mediante evaluación microscópica de las preparaciones histológicas, empleándose posteriormente esta clasificación en los análisis estadísticos.

Las asociaciones entre variables categóricas se evaluaron mediante la prueba exacta de Fisher, incluyendo el análisis entre la expresión de los biomarcadores metabólicos y el estado de progresión, así como la asociación entre los distintos biomarcadores metabólicos

La supervivencia libre de progresión (PFS, del inglés *progression free survival*) y la supervivencia global (OS, del inglés *overall survival*) se estimaron mediante el método de Kaplan–Meier, comparándose las curvas de supervivencia mediante la prueba de log-rank (Mantel–Cox).

En todos los análisis se consideró un nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

Uso de herramientas de Inteligencia artificial

Durante la elaboración de este Trabajo Fin de Máster se utilizó ChatGPT (OpenAI; modelo GPT-5.5) como herramienta de apoyo para la revisión estilística del manuscrito, la mejora de la claridad y fluidez de la redacción, la reformulación de algunos fragmentos y la organización de determinados contenidos. Esta herramienta no se empleó como fuente de información científica, ni para la generación de resultados, análisis estadísticos o conclusiones. La búsqueda bibliográfica, la selección e interpretación de la evidencia científica, así como la redacción final y la validación de todo el contenido, fueron realizadas y revisadas críticamente por la autora.

Resultados

Previo al análisis estadístico, se evaluó la expresión inmunohistoquímica de los biomarcadores incluidos en el estudio mediante observación microscópica. La **Figura 2** muestra imágenes representativas de baja y alta expresión para Ki-67, GLUT1 y GLS, así como de baja y alta infiltración para los linfocitos T CD8+, a aumentos de 10× y 40×.

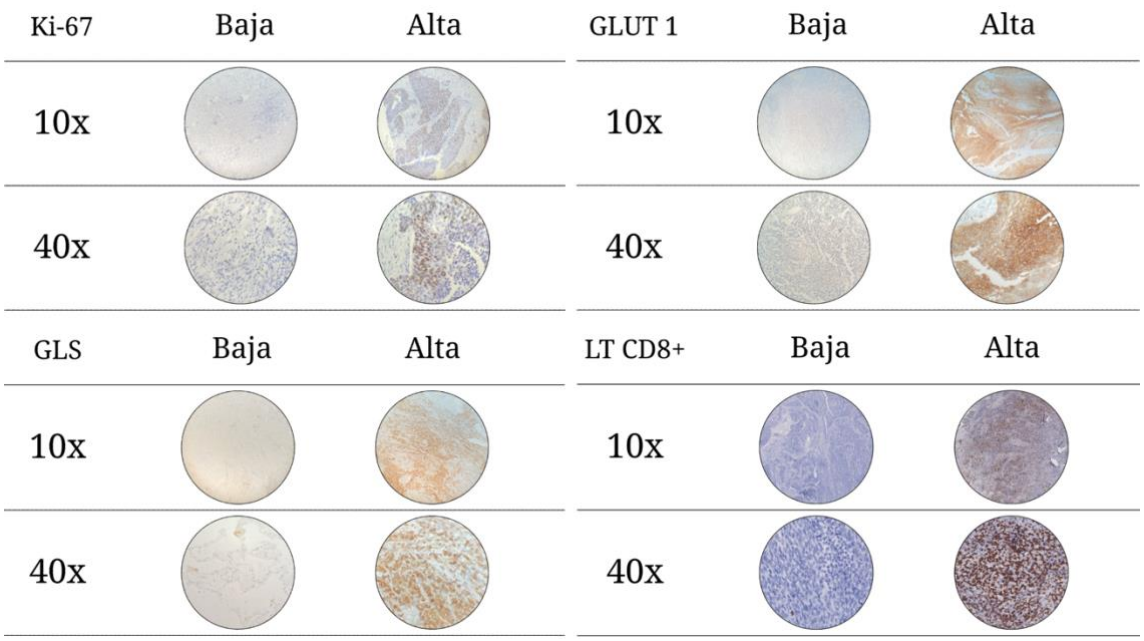


Figura 2. Imágenes representativas de la expresión inmunohistoquímica de Ki-67, GLUT1, GLS y de la infiltración de LT CD8+, mostrando ejemplos de baja y alta expresión/infiltración a aumentos de 10× y 40×. Las imágenes ilustran los patrones de tinción característicos de cada biomarcador, utilizados para la evaluación microscópica y la clasificación de los casos en categorías de baja y alta expresión o infiltración.

En todos los casos, el patrón de tinción observado fue concordante con la localización subcelular descrita para cada biomarcador. Ki-67 mostró un patrón de tinción predominantemente nuclear en las células proliferativas; GLUT1 presentó una tinción principalmente membranosa, acorde con su función como transportador de glucosa; GLS mostró un patrón citoplasmático, compatible con su localización mitocondrial; y los linfocitos T CD8+ se identificaron mediante una tinción predominantemente membranosa en el infiltrado inmunitario tumoral. Estos patrones fueron considerados adecuados para la valoración de la expresión inmunohistoquímica y la posterior clasificación de los casos en categorías de alta y baja expresión o infiltración.

Infiltración inmunitaria tumoral: Linfocitos T CD8+

Con el objetivo de evaluar la posible asociación entre la infiltración inmunitaria tumoral y la progresión de la enfermedad, se compararon el porcentaje de infiltración y la densidad de linfocitos T CD8+ entre los pacientes no progresados y progresados. El porcentaje de infiltración y la densidad de células CD8+ fueron obtenidos automáticamente mediante el software QuPath versión 0.7.0-arm64 (Bankhead et al., 2017) durante el análisis digital de las imágenes. Para la comparación entre grupos se empleó la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U.

El análisis comparativo no mostró diferencias estadísticamente significativas en la infiltración de linfocitos T CD8+ entre los pacientes no progresados y progresados (**Figura 3**). En cuanto al

porcentaje de infiltración, ambos grupos presentaron una distribución similar de los valores, con medianas próximas y un amplio grado de variabilidad interindividual (p = 0,317) (**Figura 3A**). Del mismo modo, la densidad de LT CD8+ (células/mm²) tampoco difirió significativamente entre los grupos (p = 0,386), observándose una dispersión comparable de los datos y la presencia de algunos valores extremos en ambos grupos (**Figura 3B**).

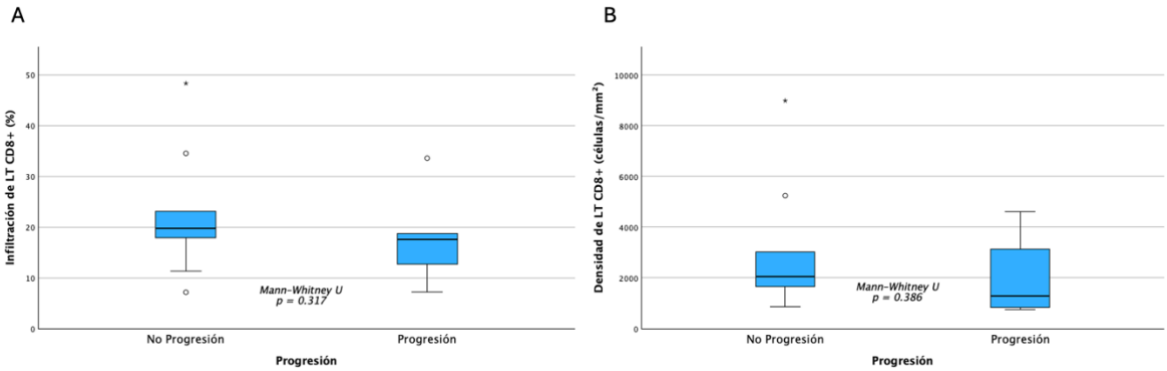


Figura 3. Porcentaje de linfocitos T CD8+ (%) (A) y densidad de linfocitos T CD8+ (células/mm²) (B), comparadas entre pacientes no progresados y progresados. Los datos se muestran mediante diagramas de caja y bigotes, donde la línea central representa la mediana, los bigotes el rango de los datos y la caja el rango intercuartílico; los puntos representan valores atípicos. El eje Y representa el porcentaje de infiltración de LT CD8+ (A) o la densidad de LT CD8+ (células/mm²) (B), mientras que el eje X corresponde a los grupos de pacientes según el estado de progresión.

Con el fin de evaluar el valor pronóstico de la infiltración de LT CD8+, tanto el porcentaje de infiltración como la densidad de LT CD8+ se categorizaron en alta (n=7) y baja (n=7) utilizando la mediana como punto de corte, 18.895 % para el porcentaje de infiltración de LT CD8+ y 1952,9 células/mm² para la densidad. A partir de esta clasificación, se analizaron la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global mediante curvas de Kaplan–Meier, comparando ambos grupos mediante la prueba de log-rank.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia libre de progresión entre los pacientes con alta y baja infiltración de LT CD8+ (**Figura 4**). No obstante, al considerar el porcentaje de infiltración (**Figura 4A**), los pacientes con alta infiltración tendieron a presentar una mayor probabilidad de permanecer libres de progresión durante el seguimiento en comparación con aquellos con bajo porcentaje de infiltración, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (log-rank, p = 0,111).

De forma similar, el análisis basado en la densidad de LT CD8+ (células/mm²) tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (log-rank, p = 0,709) (**Figura 4B**). En este caso, las curvas de supervivencia mostraron un comportamiento muy similar

a lo largo del periodo de seguimiento, sin apreciarse una separación consistente entre los pacientes con alta y baja densidad de infiltrado inmunitario.

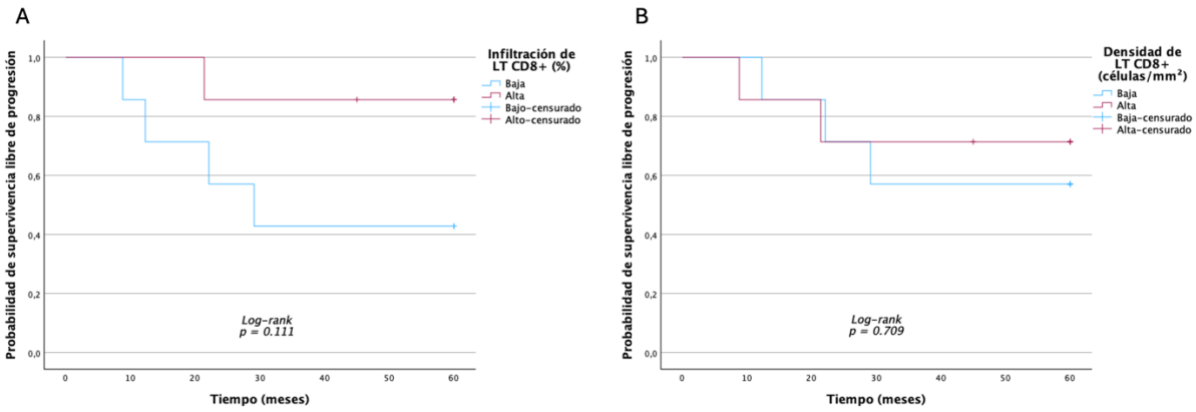


Figura 4. Curvas de supervivencia libre de progresión según el porcentaje de LT CD8+ (%) (A) y la densidad de LT CD8+ (células/mm²) (B), comparadas entre pacientes con alta y baja infiltración. Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan–Meier. El eje Y representa la probabilidad de supervivencia libre de progresión y el eje X el tiempo de seguimiento (meses). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

Tras analizar la supervivencia libre de progresión, se evaluó la supervivencia global para determinar si la infiltración de LT CD8+ se asociaba con la supervivencia de los pacientes.

El análisis de supervivencia global mostró diferencias significativas entre los pacientes con alta y baja infiltración de LT CD8+ al considerar el porcentaje de infiltración, pero no al considerar la densidad (**Figura 5A**). Los pacientes con un alto porcentaje de LT CD8+ presentaron una mayor probabilidad de supervivencia global a lo largo del seguimiento en comparación con aquellos con bajo porcentaje, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (log-rank, p = 0,022).

En cambio, cuando la supervivencia se analizó en función de la densidad de LT CD8+ (células/mm²), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alta y baja densidad de infiltrado inmunitario (log-rank, p = 0,278) (**Figura 5B**). Aunque los pacientes con alta densidad mostraron una tendencia hacia una mayor probabilidad de supervivencia global, las curvas presentaron una separación menos marcada y esta diferencia no alcanzó significación estadística.

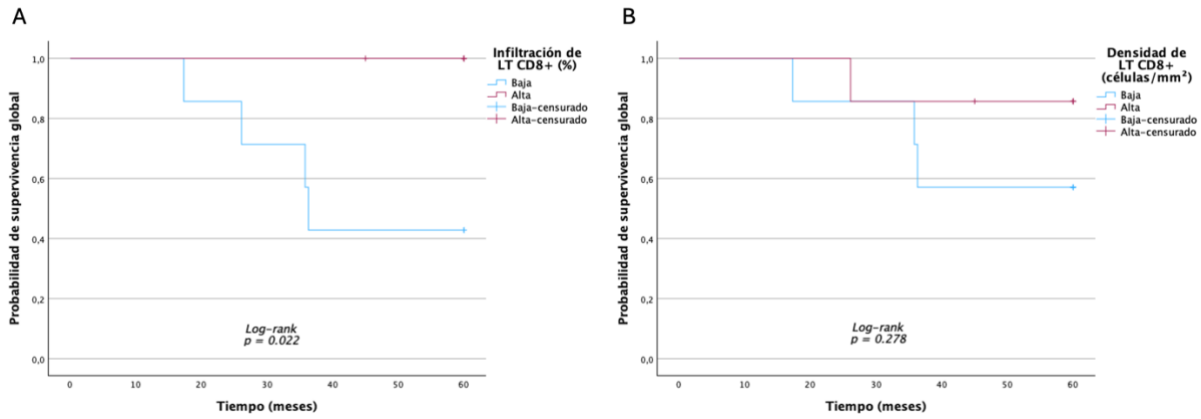


Figura 5. Curvas de supervivencia global según el porcentaje de LT CD8+ (%) (A) y la densidad de LT CD8+ (células/mm²) (B), comparadas entre pacientes con alta y baja infiltración. Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan–Meier. El eje Y representa la probabilidad de supervivencia global y el eje X el tiempo de seguimiento (meses). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

Considerando que el porcentaje de infiltración de LT CD8+ fue el único parámetro que mostró una asociación significativa con la supervivencia global, se exploró su posible relación con diferentes características clinicopatológicas. Para ello, se comparó el porcentaje de infiltración de LT CD8+ en función del sexo, el subtipo histológico y el estado tabáquico mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney U.

El análisis no mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de infiltración de LT CD8+ en función del sexo, el subtipo histológico ni el estado tabáquico (**Figura 6**). En cuanto al sexo (**Figura 6A**) las medianas fueron comparables y las diferencias no alcanzaron significación estadística (p = 0,480).

Del mismo modo, el porcentaje de LT CD8+ fue similar entre los tumores de histología escamosa y los adenocarcinomas (**Figura 6B**), sin observarse diferencias estadísticamente significativas (p = 0,565). Finalmente, tampoco se evidenciaron diferencias en función del estado tabáquico (**Figura 6C**) (p = 0,366).

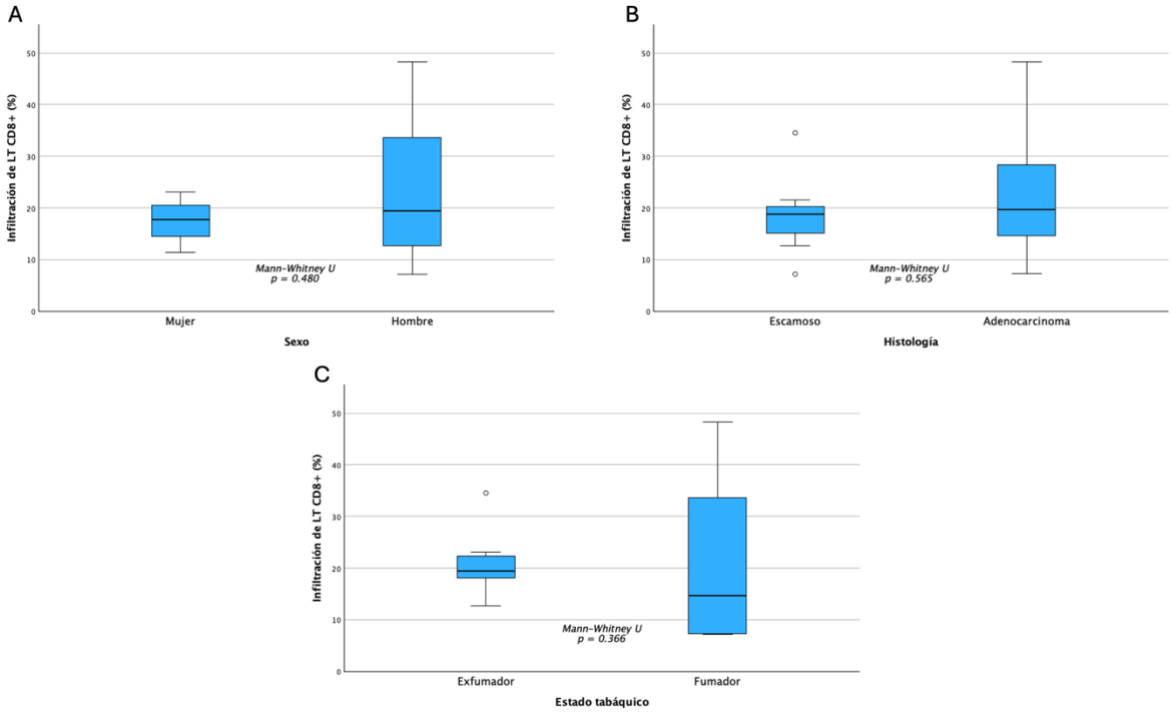


Figura 6. Comparación del porcentaje de infiltración de LT CD8+ según el sexo (A), el subtipo histológico (B) y el estado tabáquico (C). Los datos se muestran mediante diagramas de caja y bigotes, donde la línea central representa la mediana, la caja el rango intercuartílico y los bigotes el rango de los datos; los puntos representan valores atípicos. El eje Y representa el porcentaje de infiltración de LT CD8+, mientras que el eje X corresponde a las variables clinicopatológicas analizadas.

Reprogramación metabólica tumoral: GLUT1, GLS y Ki-67

Con el objetivo de investigar la posible implicación de la reprogramación metabólica tumoral en la progresión de la enfermedad, se analizó la expresión inmunohistoquímica de los biomarcadores GLUT1, GLS y Ki-67. Para cada biomarcador, se evaluó su asociación con el estado de progresión mediante análisis de contingencia y se estudió su relación con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global. Finalmente, se analizó la concordancia en la expresión de los biomarcadores metabólicos mediante análisis de contingencia.

Como primer biomarcador de la reprogramación metabólica, se evaluó la posible asociación entre la expresión de GLUT1 y el estado de progresión mediante un análisis de contingencia utilizando la prueba exacta de Fisher.

El análisis de contingencia no mostró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de GLUT1 y el estado de progresión (**Tabla 1**). La distribución de pacientes con expresión alta y baja de GLUT1 fue similar entre los grupos de no progresión y progresión, sin observarse diferencias estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher, p = 1,000).

Tabla 1. Asociación entre la expresión de GLUT1 y el estado de progresión. Los datos se expresan como frecuencia absoluta (n) y porcentaje (%). Las filas corresponden a la clasificación de la expresión de GLUT1 en alta y baja, mientras que las columnas representan el estado de progresión de los pacientes. La asociación entre ambas variables se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher.

Expresión de GLUT1	No progresión, n (%)	Progresión, n (%)	Total, n
Baja	4 (57,1)	3 (42,9)	7
Alta	10 (47,6)	11 (52,4)	21
Total	**14 (50,0)**	**14 (50,0)**	**28**

Fisher: $p = 1.000$

Tras evaluar la asociación entre la expresión de GLUT1 y el estado de progresión, se analizó el posible valor pronóstico de este biomarcador mediante curvas de Kaplan–Meier, comparando la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global entre los pacientes con alta y baja expresión de GLUT1.

El análisis de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alta y baja expresión de GLUT1, tanto para la supervivencia libre de progresión como para la supervivencia global (**Figura 7**). En relación con la supervivencia libre de progresión (**Figura 7A**), las curvas de supervivencia de ambos grupos fueron similares durante el seguimiento, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos (log-rank, p = 0,504).

Del mismo modo, el análisis de la supervivencia global (**Figura 7B**) tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (log-rank, p = 0,265). Aunque los pacientes con baja expresión de GLUT1 mostraron una mayor probabilidad de supervivencia global a lo largo del seguimiento, las diferencias observadas entre las curvas no fueron estadísticamente significativas.

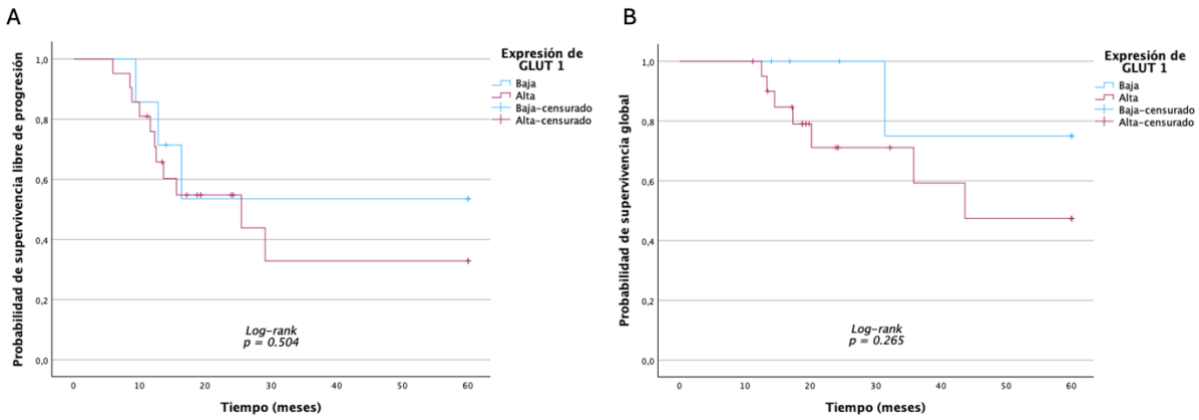


Figura 7. Curvas de supervivencia libre de progresión (A) y supervivencia global (B) según la expresión de GLUT1, comparadas entre pacientes con alta y baja expresión. Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan–Meier. El eje Y representa la probabilidad de

supervivencia libre de progresión (A) o de supervivencia global (B), mientras que el eje X corresponde al tiempo de seguimiento (meses). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

A continuación, se evaluó la posible asociación entre la expresión de GLS y el estado de progresión mediante un análisis de contingencia utilizando la prueba exacta de Fisher.

El análisis no mostró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de GLS y el estado de progresión (**Tabla 2**). La distribución de pacientes con expresión alta y baja de GLS fue similar entre los grupos de no progresión y progresión, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de progresión según el nivel de expresión del biomarcador (prueba exacta de Fisher, p = 0,704).

Tabla 2. Asociación entre la expresión de GLS y el estado de progresión. Los datos se expresan como frecuencia absoluta (n) y porcentaje (%). Las filas corresponden a la clasificación de la expresión de GLS en alta y baja, mientras que las columnas representan el estado de progresión de los pacientes. La asociación entre ambas variables se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher.

Expresión de GLS	No progresión, n (%)	Progresión, n (%)	Total, n
Baja	5 (41,7)	7 (58,3)	12
Alta	9 (56,3)	7 (43,8)	16
Total	**14 (50,0)**	**14 (50,0)**	**28**

Fisher: $p = 0.704$

Tras analizar la asociación entre la expresión de GLS y el estado de progresión, se evaluó su posible valor pronóstico mediante curvas de Kaplan–Meier, comparando la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global entre los pacientes con alta y baja expresión de GLS.

El análisis de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alta y baja expresión de GLS, tanto para la supervivencia libre de progresión como para la supervivencia global (**Figura 8**). En relación con la supervivencia libre de progresión (**Figura 8A**), las curvas de Kaplan–Meier mostraron una evolución similar entre ambos grupos, sin diferencias estadísticamente significativas (log-rank, p = 0,611).

Del mismo modo, el análisis de la supervivencia global (**Figura 8B**) tampoco evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alta y baja expresión de GLS (log-rank, p = 0,238). No obstante, se observó una tendencia a una mayor probabilidad de supervivencia global en los pacientes con baja expresión de GLS durante el seguimiento, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística.

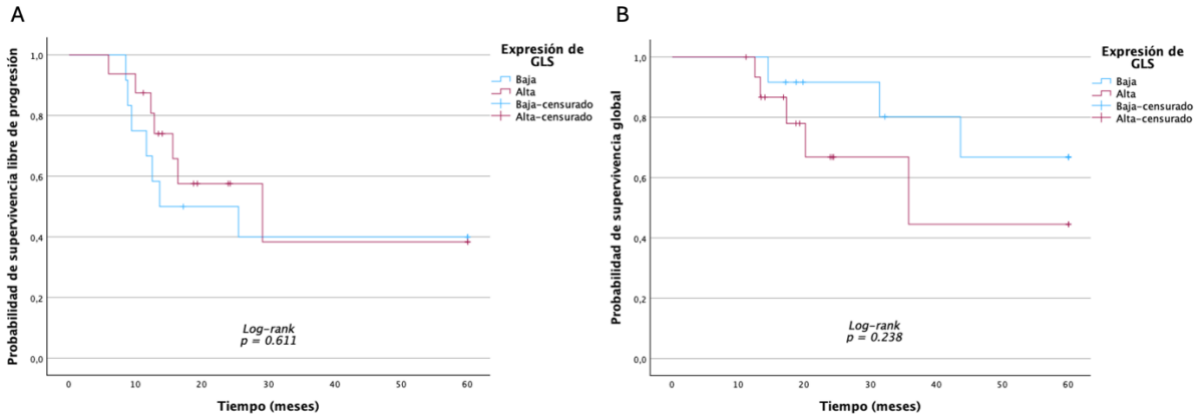


Figura 8. Curvas de supervivencia libre de progresión (A) y supervivencia global (B) según la expresión de GLS, comparadas entre pacientes con alta y baja expresión. Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan–Meier. El eje Y representa la probabilidad de supervivencia libre de progresión (A) o de supervivencia global (B), mientras que el eje X corresponde al tiempo de seguimiento (meses). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

Posteriormente, se evaluó la posible asociación entre la expresión de Ki-67 y el estado de progresión mediante un análisis de contingencia utilizando la prueba exacta de Fisher.

El análisis de contingencia no evidenció una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de Ki-67 y el estado de progresión (**Tabla 3**). La distribución de pacientes con expresión alta y baja de Ki-67 fue similar entre los grupos de no progresión y progresión, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de progresión según el nivel de expresión del biomarcador (prueba exacta de Fisher, p = 0,704).

Tabla 3. Asociación entre la expresión de Ki-67 y el estado de progresión. Los datos se expresan como frecuencia absoluta (n) y porcentaje (%). Las filas corresponden a la clasificación de la expresión de Ki-67 en alta y baja, mientras que las columnas representan el estado de progresión de los pacientes. La asociación entre ambas variables se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher.

Expresión de Ki-67	No progresión, n (%)	Progresión, n (%)	Total, n
Baja	7 (53,8)	6 (46,2)	13
Alta	7 (46,7)	8 (53,3)	15
Total	**14 (50,0)**	**14 (50,0)**	**28**

Fisher: $p = 0.704$

Tras evaluar la asociación entre la expresión de Ki-67 y el estado de progresión, se analizó su posible valor pronóstico mediante curvas de Kaplan–Meier, comparando la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global entre los pacientes con alta y baja expresión de Ki-67.

El análisis de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alta y baja expresión de Ki-67, tanto para la supervivencia libre de progresión

como para la supervivencia global (**Figura 9**). En relación con la supervivencia libre de progresión (**Figura 9A**), las curvas de Kaplan–Meier presentaron una evolución similar a lo largo del seguimiento, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (log-rank, p = 0,771).

En cuento a la supervivencia global (**Figura 9B**), tampoco se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con alta y baja expresión de Ki-67 (log-rank, p = 0,896). Las curvas de supervivencia mostraron un comportamiento prácticamente superponible durante el periodo de seguimiento, sin apreciarse una separación consistente entre ambos grupos.

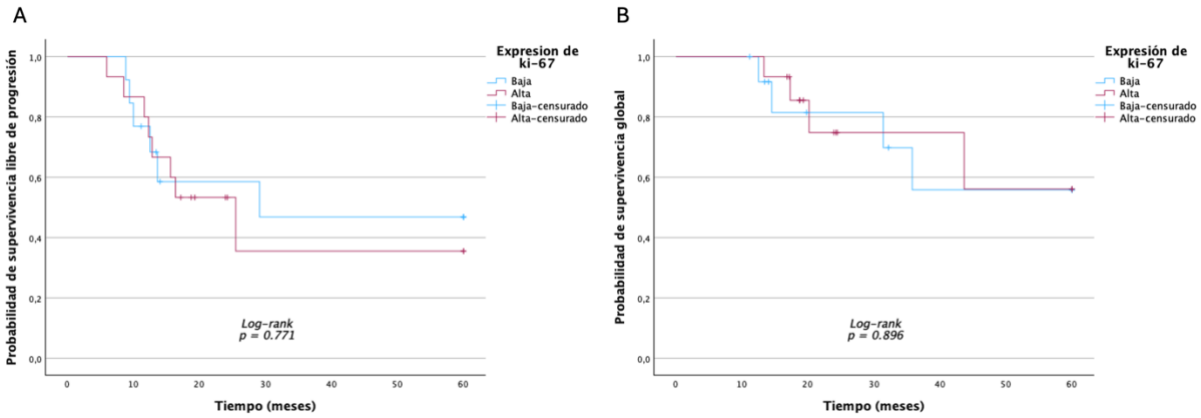


Figura 9. Curvas de supervivencia libre de progresión (A) y supervivencia global (B) según la expresión de Ki-67, comparadas entre pacientes con alta y baja expresión. Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan–Meier. El eje Y representa la probabilidad de supervivencia libre de progresión (A) o de supervivencia global (B), mientras que el eje X corresponde al tiempo de seguimiento (meses). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de log-rank.

Finalmente, se evaluó la posible asociación entre la expresión de los biomarcadores de reprogramación metabólica con el fin de determinar si una elevada expresión de un biomarcador tendía a asociarse con una elevada expresión de los demás. Para ello, se realizaron análisis de contingencia mediante la prueba exacta de Fisher.

El análisis de contingencia no mostró asociaciones estadísticamente significativas entre los biomarcadores de reprogramación metabólica analizados (**Figura 10**). En la comparación entre GLUT1 y GLS (**Figura 10A**), la distribución de tumores con expresión alta y baja fue similar, sin evidenciarse una asociación significativa entre ambos biomarcadores (prueba exacta de Fisher, p = 0,418). De igual forma, no se observaron asociaciones significativas entre la expresión de GLUT1 y Ki-67 (**Figura 10B**; p = 0,670) ni entre GLS y Ki-67 (**Figura 10C**; p = 0,445), mostrando una distribución comparable de los casos en las diferentes categorías de expresión.

A

Expresión de GLUT1	GLS baja, n (%)	GLS alta, n (%)	Total, n
Baja	4 (57,1)	3 (42,9)	7
Alta	8 (38,1)	13 (61,9)	21
Total	**12 (42,9)**	**16 (57,1)**	**28**

Fisher: $p = 0.418$

B

Expresión de GLUT1	Ki-67 bajo, n (%)	Ki-67 alto, n (%)	Total, n
Baja	4 (57,1)	3 (42,9)	7
Alta	9 (42,9)	12 (57,1)	21
Total	**13 (46,4)**	**15 (53,6)**	**28**

Fisher: $p = 0.670$

C

Expresión de GLS	Ki-67 bajo, n (%)	Ki-67 alto, n (%)	Total, n
Baja	7 (58,3)	5 (41,7)	12
Alta	6 (37,5)	10 (62,5)	16
Total	**13 (46,4)**	**15 (53,6)**	**28**

Fisher: $p = 0.445$

Figura 10. Asociación entre la expresión de GLUT1 y GLS (A), GLUT1 y Ki-67 (B), y GLS y Ki-67 (C). Los datos se expresan como frecuencia absoluta (n) y porcentaje (%). Las filas y columnas corresponden a la clasificación de la expresión de cada biomarcador en alta y baja. La asociación entre los biomarcadores se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher.

Discusión

El presente estudio evaluó la infiltración tumoral por linfocitos T CD8+ y la expresión de biomarcadores relacionados con la reprogramación metabólica en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) que no alcanzaron una respuesta patológica completa (non-pCR) tras quimioinmunoterapia neoadyuvante. El principal hallazgo fue la asociación entre un mayor porcentaje de infiltración por LT CD8+ y una mayor supervivencia global, mientras que la densidad del infiltrado y la expresión de GLUT1, GLS y Ki-67 no mostraron asociación con la progresión de la enfermedad ni con la supervivencia. Estos resultados sugieren que la composición del microambiente inmunitario podría aportar más información pronóstica que la evaluación individual de biomarcadores metabólicos mediante inmunohistoquímica.

La infiltración tumoral por LT CD8+ se ha asociado de forma consistente con una respuesta antitumoral más eficaz y un mejor pronóstico en pacientes con NSCLC, especialmente en el contexto de la inmunoterapia (Brambilla et al., 2016; Farhood et al., 2018). En este sentido, la asociación observada entre un mayor porcentaje de LT CD8+ y una mayor supervivencia global resulta coherente con el papel de estas células en el reconocimiento y eliminación de células tumorales, así como en el control de la enfermedad residual (Chen & Mellman, 2017).

Un hallazgo especialmente relevante fue que la asociación pronóstica únicamente se observó al evaluar el infiltrado como porcentaje de LT CD8+, mientras que la densidad

(células/mm²) no mostró relación significativa con la supervivencia. Aunque ambas variables cuantifican la infiltración inmunitaria, aportan información biológica diferente. El porcentaje refleja la proporción de linfocitos respecto al total de células presentes en el tejido y, por tanto, la composición relativa del microambiente tumoral, mientras que la densidad expresa el número absoluto de linfocitos por unidad de superficie (Bruni et al., 2020; Binnewies et al., 2018). En consecuencia, tumores con densidades similares pueden presentar porcentajes de infiltración diferentes debido a variaciones en la celularidad tumoral y estromal, lo que podría explicar la mayor capacidad discriminativa observada para el porcentaje de infiltración en esta cohorte.

Asimismo, la asociación se observó con la supervivencia global, pero no con la supervivencia libre de progresión. Aunque ambas variables evalúan la evolución clínica, reflejan aspectos diferentes del curso de la enfermedad. La supervivencia libre de progresión depende principalmente del tiempo hasta la recaída o progresión y puede verse influida por factores como la carga tumoral residual, la eficacia de la cirugía o los tratamientos administrados tras la recaída (Forde et al., 2022). Por el contrario, la supervivencia global constituye un desenlace más global que integra la evolución clínica a largo plazo y el efecto acumulado de las distintas estrategias terapéuticas, por lo que podría reflejar con mayor precisión el impacto biológico de determinados biomarcadores (Forde et al., 2022; Provencio et al., 2024). En este contexto, un elevado porcentaje de infiltración por LT CD8+ podría favorecer un mejor control de la enfermedad residual y de las micrometástasis, traduciéndose en un beneficio en la supervivencia global sin modificar necesariamente el tiempo hasta la progresión (Bruni et al., 2020; Sharma et al., 2017).

Finalmente, la ausencia de asociación entre el porcentaje de LT CD8+ y las variables clinicopatológicas analizadas sugiere que el valor pronóstico observado podría depender principalmente de las características del microambiente inmunitario y no de factores clínicos basales. Dado que los pacientes non-pCR constituyen un grupo con elevada heterogeneidad evolutiva y escasos biomarcadores pronósticos disponibles, la validación de estos hallazgos en cohortes independientes de mayor tamaño podría contribuir a mejorar la estratificación pronóstica e identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de progresión que podrían beneficiarse de estrategias terapéuticas adyuvantes más intensivas, evitando al mismo tiempo un posible sobretratamiento en pacientes con menor riesgo de recaída (Provencio et al., 2024).

A diferencia del porcentaje de LT CD8+, ninguno de los biomarcadores metabólicos analizados (GLUT1, GLS y Ki-67) mostró asociación con el estado de progresión, la supervivencia libre de progresión ni la supervivencia global. Aunque estos resultados contrastan con la evidencia que relaciona la reprogramación metabólica con la agresividad tumoral y la resistencia terapéutica en NSCLC (Faubert et al., 2020; Martínez-Reyes & Chandel, 2021), deben

interpretarse considerando la complejidad del metabolismo tumoral y las características metodológicas del estudio.

GLUT1 favorece el incremento de la captación de glucosa y la glucólisis aeróbica, GLS participa en la glutaminólisis y Ki-67 constituye un marcador ampliamente utilizado de proliferación celular, procesos que se han asociado con peor pronóstico en NSCLC (Park et al., 2023; Li et al., 2025; Wang et al., 2021). Sin embargo, la evaluación individual de estos biomarcadores mediante inmunohistoquímica podría no reflejar adecuadamente la elevada plasticidad metabólica de las células tumorales. La capacidad de un tumor para alternar entre distintas rutas de obtención de energía hace improbable que una única proteína represente de forma fiable el estado metabólico global del tumor (Faubert et al., 2020).

La ausencia de asociación también podría explicarse por las diferencias metodológicas respecto a los resultados previos del grupo obtenidos mediante transcriptómica espacial. Mientras esta tecnología analiza simultáneamente la expresión de un elevado número de genes preservando su localización dentro del tejido, la inmunohistoquímica evalúa únicamente la expresión de una proteína concreta (Moses & Pachter, 2022). Además, la expresión génica no siempre se correlaciona con la expresión proteica debido a mecanismos de regulación postranscripcional y postraduccional (Liu et al., 2016). Por tanto, la ausencia de asociación observada mediante inmunohistoquímica no excluye la implicación de estas rutas metabólicas en la progresión tumoral.

En este contexto, el análisis combinado de diferentes biomarcadores podría aportar más información biológica que la evaluación individual de cada uno de ellos. La integración de marcadores representativos de distintas rutas metabólicas, como GLUT1 junto con TOMM20 o MT-CO1, permitiría estimar el equilibrio entre glucólisis y fosforilación oxidativa, proporcionando una aproximación más completa a la flexibilidad metabólica tumoral, uno de los principales mecanismos implicados en la resistencia al tratamiento (Cruz-Bermúdez et al., 2019; Faubert et al., 2020).

Desde el punto de vista metodológico, la cuantificación automatizada mediante QuPath constituye una fortaleza del estudio, al permitir el análisis objetivo de un elevado número de células, reducir la variabilidad interobservador y minimizar el sesgo derivado de la evaluación visual, mejorando así la reproducibilidad respecto al recuento manual, un aspecto especialmente relevante en estudios basados en biomarcadores tisulares (Bankhead et al., 2017). Asimismo, la inmunohistoquímica presenta la ventaja de ser una técnica ampliamente estandarizada, reproducible y fácilmente implementable en la práctica clínica. No obstante, el análisis individual de los biomarcadores no permite evaluar de forma simultánea las complejas interacciones existentes entre las células tumorales y el microambiente inmunitario (Tan et al., 2020; Bolognesi

et al., 2017). En este contexto, la inmunofluorescencia multiplex representa una alternativa prometedora, ya que posibilita la detección simultánea de múltiples proteínas y preserva la información espacial del tejido, permitiendo analizar la coexistencia de diferentes poblaciones celulares, sus fenotipos funcionales y su distribución dentro del microambiente tumoral (Tan et al., 2020). La incorporación de este tipo de aproximaciones en futuros estudios podría contribuir a comprender mejor la interacción entre la reprogramación metabólica y la respuesta inmunitaria en pacientes con NSCLC tratados con quimioinmunoterapia.

Finalmente, los resultados del presente estudio deben interpretarse considerando varias limitaciones. En primer lugar, el reducido tamaño muestral puede haber limitado la potencia estadística para detectar diferencias entre grupos, especialmente en los análisis de supervivencia. Además, el carácter retrospectivo del estudio no permite establecer relaciones causales entre la expresión de los biomarcadores y la evolución clínica de los pacientes. Por último, el empleo de inmunohistoquímica permitió evaluar la expresión individual de cada biomarcador, pero no analizar de forma integrada la organización espacial del microambiente tumoral ni las interacciones entre las distintas poblaciones celulares.

A pesar de estas limitaciones, los resultados obtenidos apoyan el posible valor pronóstico de la infiltración por LT CD8+ en pacientes con NSCLC que no alcanzan una respuesta patológica completa tras quimioinmunoterapia neoadyuvante. La asociación observada entre un mayor porcentaje de infiltración por LT CD8+ y una mayor supervivencia global sugiere que este parámetro podría contribuir a una mejor estratificación pronóstica de este grupo de pacientes, siempre que estos hallazgos sean confirmados en cohortes independientes y de mayor tamaño. La identificación de biomarcadores con potencial utilidad pronóstica favorecería el desarrollo de estrategias de seguimiento y tratamiento más personalizadas, contribuyendo a mejorar la calidad de la atención oncológica. Este enfoque se encuentra alineado con el Objetivo de Desarrollo Sostenible 3 (ODS 3) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, cuyo objetivo es garantizar una vida sana y promover el bienestar para todas las personas mediante el impulso de una atención sanitaria de calidad, basada en la evidencia y orientada a mejorar los resultados en salud (United Nations, 2015).

Futuros estudios deberían incorporar cohortes multicéntricas y profundizar en la caracterización metabólica del tumor mediante la evaluación de biomarcadores mitocondriales y biosintéticos como TOMM20, MT-CO1 y TYMS, inicialmente incluidos en el diseño del estudio, pero cuya evaluación no pudo completarse debido a la optimización de los protocolos de inmunohistoquímica. La evidencia disponible relaciona estos biomarcadores con la adaptación metabólica, la resistencia al tratamiento y la progresión tumoral en NSCLC, por lo que su análisis conjunto con biomarcadores inmunitarios o metabólicos podría mejorar la caracterización

biológica de los pacientes con enfermedad residual (Cruz-Bermúdez et al., 2019; Geng, 2024; Islam et al., 2025). Asimismo, la incorporación de técnicas como la inmunofluorescencia multiplex o la transcriptómica espacial permitiría analizar simultáneamente múltiples biomarcadores y preservar su organización espacial, proporcionando una visión más completa de la interacción entre el metabolismo tumoral y la respuesta inmunitaria (Tan et al., 2020; Moses & Pachter, 2022).

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la relevancia del microambiente inmunitario en la evolución del NSCLC tratado con quimioinmunoterapia neoadyuvante y ponen de manifiesto la necesidad de integrar biomarcadores inmunitarios, metabólicos y espaciales favoreciendo el desarrollo de estrategias terapéuticas cada vez más personalizadas para los pacientes con enfermedad residual tras quimioinmunoterapia neoadyuvante.

Conclusiones

Las conclusiones del presente trabajo fueron:

1. El porcentaje de linfocitos T CD8+ fue el único parámetro que mostró asociación con la supervivencia global en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) que no alcanzaron una respuesta patológica completa (non-pCR) tras quimioinmunoterapia neoadyuvante, lo que sugiere su posible utilidad como biomarcador pronóstico en este subgrupo de pacientes.
2. La densidad de linfocitos T CD8+ (células/mm²) no mostró asociación con la supervivencia ni con la progresión de la enfermedad, indicando que el porcentaje de infiltración podría reflejar de forma más adecuada la composición del microambiente inmunitario y aportar una mayor capacidad pronóstica.
3. La expresión inmunohistoquímica de los biomarcadores de reprogramación metabólica GLUT1, GLS y Ki-67 no se asoció con el estado de progresión, la supervivencia libre de progresión ni la supervivencia global en la cohorte analizada, por lo que su utilidad como biomarcadores pronósticos no pudo demostrarse en las condiciones del presente estudio.
4. La cuantificación automatizada del infiltrado inmunitario mediante QuPath permitió una evaluación objetiva y reproducible del porcentaje y la densidad de linfocitos T CD8+, constituyendo una herramienta útil para el análisis digital de biomarcadores tisulares.

En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la relevancia del microambiente inmunitario en la evolución de los pacientes con NSCLC non-pCR tratados con quimioinmunoterapia neoadyuvante. Aunque los biomarcadores metabólicos analizados no mostraron valor pronóstico en esta cohorte, el porcentaje de infiltración por linfocitos T CD8+ emergió como un potencial biomarcador asociado a una mayor supervivencia global. La validación de estos hallazgos en cohortes multicéntricas de mayor tamaño, junto con la

incorporación de biomarcadores mitocondriales y biosintéticos, estrategias de análisis multiparamétrico y técnicas de caracterización espacial, podría contribuir a una caracterización biológica más precisa de estos pacientes, mejorar la estratificación pronóstica y favorecer el desarrollo de estrategias terapéuticas más personalizadas.

Bibliografía

Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 16878. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5

Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crinò, L., Eberhardt, W. E. E., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E. E., Holgado, E., Waterhouse, D., Ready, N., Gainor, J., Arén Frontera, O., Havel, L., Steins, M., Garassino, M. C., Aerts, J. G., Domine, M., … Spigel, D. R. (2015). Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(2), 123–135. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627

Brambilla, E., Le Teuff, G., Marguet, S., Lantuejoul, S., Dunant, A., Graziano, S., Pirker, R., Douillard, J.-Y., Le Chevalier, T., Filipits, M., Rosell, R., Kratzke, R., Popper, H., Soria, J.-C., Shepherd, F. A., Seymour, L., & Tsao, M. S. (2016). Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 34(11), 1223–1230. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.0970

Bruni, D., Angell, H. K., & Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nature Reviews Cancer*, 20(11), 662–680. https://doi.org/10.1038/s41568-020-0285-7

Casal-Mouriño, A., Ruano-Ravina, A., Lorenzo-González, M., Rodríguez-Martínez, Á., Giraldo-Osorio, A., Varela-Lema, L., Pereiro-Brea, T., Barros-Dios, J. M., Valdés-Cuadrado, L., & Pérez-Ríos, M. (2021). Epidemiology of stage III lung cancer: Frequency, diagnostic characteristics, and survival. *Translational Lung Cancer Research*, 10(1), 506–518. https://doi.org/10.21037/tlcr.2020.03.40

Centers for Disease Control and Prevention. (2025, June 10). *U.S. Cancer Statistics: Lung Cancer Stat Bite. United States Cancer Statistics*. https://www.cdc.gov/united-states-cancer-statistics/publications/lung-cancer-stat-bite.html

Chamizo, C., Zazo, S., Dómine, M., Cristóbal, I., García-Foncillas, J., Rojo, F., & Madoz-Gúrpide, J. (2015). Thymidylate synthase expression as a predictive biomarker of pemetrexed sensitivity in advanced non-small cell lung cancer. *BMC Pulmonary Medicine*, 15, 132. https://doi.org/10.1186/s12890-015-0132-x

Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330. https://doi.org/10.1038/nature21349

Cruz-Bermúdez, A., Laza-Briviesca, R., Vicente-Blanco, R. J., García-Grande, A., Coronado, M. J., Laine-Menéndez, S., Palacios-Zambrano, S., Moreno-Villa, M. R., Ruiz-Valdepeñas, A. M., Lendinez, C., Romero, A., Franco, F., Calvo, V., Alfaro, C., Acosta, P. M., Salas, C., Garcia, J. M., & Provencio, M. (2019). Cisplatin resistance involves a metabolic reprogramming through ROS and PGC-1α in NSCLC which can be overcome by OXPHOS inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*, 135, 167–181. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.009

Cruz-Bermúdez, A., Vicente-Blanco, R. J., Laza-Briviesca, R., García-Grande, A., Laine-Menéndez, S., Gutiérrez, L., Calvo, V., Romero, A., Martín-Acosta, P., García, J. M., & Provencio, M. (2017). PGC-1alpha levels correlate with survival in patients with stage III NSCLC and may define a new biomarker to metabolism-targeted therapy. *Scientific Reports*, 7(1), 16661. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17009-6

Farhood, B., Najafi, M., & Mortezaee, K. (2018). CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8509–8521. https://doi.org/10.1002/jcp.27782

Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*, *368*(6487). https://doi.org/10.1126/science.aaw5473

Forde, P. M., Spicer, J., Lu, S., Provencio, M., Mitsudomi, T., Awad, M. M., Felip, E., Broderick, S. R., Brahmer, J. R., Swanson, S. J., Kerr, K., Wang, C., Ciuleanu, T.-E., Saylors, G. B., Tanaka, F., Ito, H., Chen, K.-N., Liberman, M., Vokes, E. E., … Girard, N. (2022). Neoadjuvant nivolumab plus chemotherapy in resectable lung cancer. *New England Journal of Medicine*, *386*(21), 1973–1985. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202170

Geng, Y. (2024). Unveiling the oncogenic significance of thymidylate synthase in human cancers. *American Journal of Translational Research*, *16*(10), 5228–5247. https://doi.org/10.62347/IRUZ1011

Guo, W., Sun, S., Guo, L., Song, P., Xue, X., Zhang, H., Zhang, G., Li, R., Gao, Y., Qiu, B., Tan, F., Xue, Q., Gao, S., & He, J. (2020). Elevated SLC2A1 expression correlates with poor prognosis in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: A Study Based on Immunohistochemical Analysis and Bioinformatics. *DNA and Cell Biology*, *39*(4), 631–644. https://doi.org/10.1089/dna.2019.5291

Hegde, P. S., & Chen, D. S. (2020). Top 10 challenges in cancer immunotherapy. *Immunity*, *52*(1), 17–35. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.011

Islam, R., Roche, M. E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Diaz-Barros, V., Serrano, E., Martinez Cantarin, M. P., Philp, N. J., Basu Mallick, A., & Martinez-Outschoorn, U. (2025). TOMM20 as a driver of cancer aggressiveness via oxidative phosphorylation, maintenance of a reduced state, and resistance to apoptosis. *Molecular Oncology*, *19*(8), 2431–2455. https://doi.org/10.1002/1878-0261.70002

Li, D., Cao, D., Zhang, Y., Yu, X., Wu, Y., Jia, Z., Jiang, J., & Cao, X. (2025). Integrative pan-cancer analysis and experiment validation identified GLS as a biomarker in tumor progression, prognosis, immune microenvironment, and immunotherapy. *Scientific Reports*, *15*(1), 525. https://doi.org/10.1038/s41598-024-84916-w

Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, 165(3), 535–550. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014

Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2021). Cancer metabolism: looking forward. *Nature Reviews Cancer*, *21*(10), 669–680. https://doi.org/10.1038/s41568-021-00378-6

Moses, L., & Pachter, L. (2022). Museum of spatial transcriptomics. Nature Methods, 19(5), 534–546. https://doi.org/10.1038/s41592-022-01409-2

Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., & Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *Journal of Thoracic Oncology*, *17*(3), 362–387. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003

Park, S. Y., Cho, D.-G., Shim, B.-Y., & Cho, U. (2023). Relationship between Systemic Inflammatory Markers, GLUT1 Expression, and Maximum 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Non-Small Cell Lung Carcinoma and Their Prognostic Significance. *Diagnostics*, *13*(6), 1013. https://doi.org/10.3390/diagnostics13061013

Provencio, M., Nadal, E., González-Larriba, J. L., Martínez-Martí, A., Bernabé, R., Bosch-Barrera, J., Casal-Rubio, J., Calvo, V., Insa, A., Ponce, S., Reguart, N., de Castro, J., Mosquera, J., Cobo, M., Aguilar, A., López Vivanco, G., Camps, C., López-Castro, R., Morán, T., Romero, A. (2023). Perioperative Nivolumab and Chemotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. New England Journal of Medicine, 389(6), 504–513. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2215530

Provencio, M., Nadal, E., Insa, A., García-Campelo, M. R., Casal-Rubio, J., Dómine, M., Majem, M., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Martí, A., De Castro Carpeño, J., Cobo, M., López Vivanco, G., Del Barco, E., Bernabé Caro, R., Viñolas, N., Barneto Aranda, I., Viteri, S., Pereira,

E., Royuela, A., … Cruz-Bermúdez, A. (2020). Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. The Lancet Oncology, 21(11), 1413–1422. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30453-8

Provencio, M., Nadal, E., Insa, A., García Campelo, R., Casal, J., Dómine, M., Massuti, B., Majem, M., Rodríguez-Abreu, D., Martínez-Martí, A., de Castro, J., Gómez de Antonio, D., Macia, I., Figueroa, S., Fernández Vago, L., Calvo, V., Palmero, R., Sierra-Rodero, B., Martínez-Toledo, C., Cruz-Bermúdez, A. (2024). Perioperative chemotherapy and nivolumab in non-small-cell lung cancer (NADIM): 5-year clinical outcomes from a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, *25*(11), 1453–1464. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(24)00498-4

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell*, *168*(4), 707–723. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017

Singh, R. K., Saini, S. K., Prakasam, G., Kalairasan, P., & Bamezai, R. N. K. (2019). Role of ectopically expressed mtDNA encoded cytochrome c oxidase subunit I (MT-COI) in tumorigenesis. *Mitochondrion*, *49*, 56–65. https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.07.002

Smolarz, B., Łukasiewicz, H., Samulak, D., Piekarska, E., Kołaciński, R., & Romanowicz, H. (2025). Lung cancer—epidemiology, pathogenesis, treatment and molecular aspect (review of literature). *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(5), 2049. https://doi.org/10.3390/ijms26052049

Sociedad Española de Oncología Médica. (2025). Las cifras del cáncer en España 2025. https://seom.org/publicaciones/el-cancer-en-espanya

Stinchcombe, T. E. (2023). Narrative review: blood and tumor biomarker testing in non-small cell lung cancer without an oncogenic driver. *Translational Lung Cancer Research*, *12*(1), 158–167. https://doi.org/10.21037/tlcr-22-530

Tan, W. C. C., Nerurkar, S. N., Cai, H. Y., Ng, H. H. M., Wu, D., Wee, Y. T. F., Lim, J. C. T., Yeong, J., & Lim, T. K. H. (2020). Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Communications*, 40(4), 135–153. https://doi.org/10.1002/cac2.12023

Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V, Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, *398*(10299), 535–554. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3

United Nations. (2015). *Transforming our world: The 2030 Agenda for Sustainable Development.* https://sdgs.un.org/2030agenda

Wang, D., Ye, W., & Shi, Q. (2021). Prognostic value of Ki-67 xxpression in advanced lung squamous cell carcinoma patients treated with chemotherapy. *Cancer Management and Research*, *13*, 6429–6436. https://doi.org/10.2147/CMAR.S326189

World Health Organization. (2021). *Thoracic tumours* (WHO Classification of Tumours Editorial Board, Ed.; 5th ed., Vol. 5). International Agency for Research on Cancer.

Anexos

Anexo I: Características de los anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica.

Tabla A1. Características de los anticuerpos empleados durante la optimización inmunohistoquímica

Biomarcador	Anticuerpo primario	Diana	Especie	Referencia	Anticuerpo Secundario	Diana	Especie	referencia
TOMM20	Anti-TOMM20 antibody [EPR15581-54] – Mitochondrial Marker	TOMM20 (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20*)- Humano	Conejo	ab186735, Abcam	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed	IgG conejo	Cabra	ab7090, Abcam
MT-CO1	Anti-MTCO1 antibody [1D6E1A8]	MT-COI (*Cytochrome c oxidase subunit I*)- Humano	Ratón	ab14705, Abcam	Goat Anti-Mouse IgG2a heavy chain (HRP) preadsorbed	IgG2a Ratón	Cabra	ab98698, Abcam
TYMS	Anti-Thymidylate Synthase antibody [EPR4545]	Timidilato sintetasa (TYMS)- Humano	Conejo	ab108995, Abcam	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) preadsorbed	IgG conejo	Cabra	ab7090, Abcam

Nota. Se resumen los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el análisis de los biomarcadores TOMM20, MT-CO1 y TYMS, incluyendo sus referencias comerciales.

Anexo II: Diseño experimental para la optimización inmunohistoquímica de TOMM20, MT-CO1 y TYMS

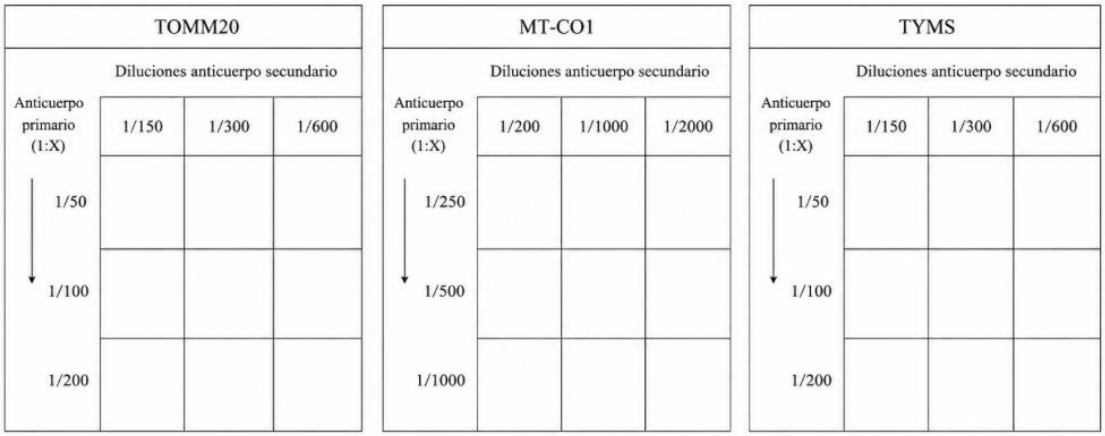


Figura A1. Diseño experimental 3×3 para la optimización inmunohistoquímica de TOMM20, MT-CO1 y TYMS. Se representan las diferentes combinaciones de diluciones evaluadas para los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes a los biomarcadores TOMM20, MT-CO1 y TYMS durante la fase de puesta a punto experimental.