



**Somos calidad,  
somos USC**

**LC-MS/MS aplicado en la proteómica para la identificación de sangre, semen  
y saliva en evidencia forense (2020–2025): revisión sistemática.**

**Autor**

**Juan Jose Yara Rosero**

**Químico Farmacéutico**

**Director**

**Yhors Alexander Ciro Monsalve**

**Grupo de Investigación  
Química y biotecnología (QUIBIO)**

**Línea de Investigación  
Desarrollos Tecnológicos y Biotecnológicos**

**Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Química Farmacéutica  
Universidad Santiago de Cali  
Santiago de Cali - Colombia  
2026**

## IMPACTOS

<b>IMPACTO</b>	<b>PRODUCTO</b>	<b>BENEFICIARIO(S)</b>
<b>Científico</b>	Revisión sistemática 2020–2025: mapa de estudios, comparación de estrategias (dirigidas/no dirigidas)	Comunidad científica
<b>Tecnológico</b>	Recomendaciones para implementación de flujos LC-MS/MS	Laboratorios forenses con plataformas LC-MS/MS, proveedores/áreas de instrumentación, redes de laboratorios.
<b>Social</b>	Mejor sustento científico para decisiones en investigación penal (delitos violentos y sexuales), favoreciendo acceso a justicia y disminución de controversias técnicas.	Sistema judicial, fiscalías, medicina legal, víctimas, comunidad.

# LC-MS/MS APLICADO EN LA PROTEOMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SANGRE, SEMEN Y SALIVA EN EVIDENCIA FORENSE (2020–2025): REVISIÓN SISTEMÁTICA.

Juan Jose Yara Rosero autor<sup>1</sup> (juan.yara00@usc.edu.co)

<sup>1</sup>Programa de Química farmacéutica. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

## RESUMEN

La identificación de fluidos corporales es un elemento clave en el análisis de la evidencia biológica en el ámbito forense, ya que aporta información contextual esencial para la reconstrucción de los hechos. Sin embargo, los métodos serológicos tradicionales presentan limitaciones importantes en cuanto a especificidad, sensibilidad y consumo de muestra, especialmente cuando se analizan evidencias degradadas, de bajo volumen o en forma de mezclas. En este escenario, la proteómica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) ha surgido como una alternativa analítica con alto potencial confirmatorio. El objetivo de la presente revisión sistemática fue analizar la literatura publicada entre 2020 y 2025 sobre el uso de LC-MS/MS para la identificación de sangre, semen y saliva en evidencia forense. La metodología se desarrolló conforme a la guía PRISMA 2020, mediante una búsqueda sistemática en las bases de datos PubMed, ScienceDirect y Scopus. Se seleccionaron seis estudios que emplearon enfoques proteómicos dirigidos, no dirigidos o combinados, y que evaluaron distintos tipos de muestras, como manchas biológicas secas, mezclas, muestras degradadas y residuos posteriores a la extracción de ADN. Los resultados mostraron que LC-MS/MS permite identificar marcadores proteicos específicos de cada fluido con alta sensibilidad y especificidad. Asimismo, se evidenció una alta calidad metodológica general, aunque persistió heterogeneidad en las estrategias analíticas y en las métricas de desempeño reportadas.

**PALABRAS CLAVE:** *Biomarcadores proteicos; espectrometría de masas; fluidos corporales; serología forense; validación analítica.*

## HIGHLIGHTS

- LC-MS/MS permitió identificar de forma confirmatoria sangre, semen y saliva en evidencias forenses complejas.
- Los marcadores proteicos mantuvieron un alto desempeño analítico en muestras degradadas, mezclas y evidencia de volumen limitado.
- La proteómica forense se consolidó como una herramienta complementaria a la genética, con potencial de implementación en laboratorios periciales.

# LC-MS/MS APPLIED IN PROTEOMICS FOR THE IDENTIFICATION OF BLOOD, SEMEN AND SALIVA IN FORENSIC EVIDENCE (2020–2025): SYSTEMATIC REVIEW.

## ABSTRACT

The identification of bodily fluids is a key element in the analysis of biological evidence in the forensic field, as it provides essential contextual information for reconstructing events. However, traditional serological methods have important limitations in terms of specificity, sensitivity, and sample consumption, especially when degraded, low-volume, or mixed evidentiary samples are analyzed. In this context, proteomics based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) has emerged as an analytical alternative with strong confirmatory potential.

The aim of this systematic review was to analyze the literature published between 2020 and 2025 on the use of LC–MS/MS for the identification of blood, semen, and saliva in forensic evidence. The methodology was conducted in accordance with the PRISMA 2020 guideline, through a systematic search in the PubMed, ScienceDirect, and Scopus databases. Six studies were selected that used targeted, untargeted, or combined proteomic approaches and evaluated different sample types, such as dried biological stains, mixtures, degraded samples, and residues remaining after DNA extraction. The results showed that LC–MS/MS enables the identification of fluid-specific protein markers with high sensitivity and specificity. Overall methodological quality was high, although heterogeneity persisted in analytical strategies and in the performance metrics reported.

**Keywords:** *Analytical validation; body fluids; forensic serology; mass spectrometry; protein biomarkers.*

## HIGHLIGHTS

- LC-MS/MS allowed the confirmatory identification of blood, semen, and saliva in complex forensic evidence.
- Protein markers maintained high analytical performance in degraded samples, mixtures, and low-volume evidence.
- Forensic proteomics emerged as a complementary tool to genetics for implementation in forensic laboratories.

## 1. INTRODUCCIÓN

La identificación de los fluidos corporales es un componente esencial del análisis de la evidencia biológica en el ámbito forense, ya que esto permite aportar información relevante para la reconstrucción de los eventos ocurridos en una escena del crimen. La determinación del tipo de fluido (sangre, semen o saliva) puede orientar el cómo se interpretan los resultados genéticos, puede apoyar hipótesis investigativas y contribuir a la valoración probatoria de los hallazgos. Sin embargo, los métodos tradicionales para esta finalidad, los cuales principalmente son basados en pruebas presuntivas y en ensayos inmunológicos, presentan importantes limitaciones en términos de especificidad, sensibilidad y el consumo de muestras, especialmente cuando se enfrentan a diferentes escenarios forenses reales en los cuales se presentan manchas degradadas, cantidad limitada de material o mezclas de fluido (Zaarour et al., 2024)

La proteómica basada en espectrometría de masas ha surgido como una avanzada alternativa analítica para la identificación de los fluidos corporales. Esta alternativa permite la detección simultánea de múltiples proteínas y péptidos característicos de cada fluido, proporcionando perfiles moleculares con mayor capacidad discriminante que las pruebas convencionales. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS) se ha consolidado como una plataforma predominante en estudios de proteómica, debido a su alta sensibilidad, selectividad y capacidad para analizar matrices biológicas complejas en condiciones de interés para el análisis forense (Parker et al., 2021)

En diferentes trabajos se ha demostrado que los perfiles proteómicos de los fluidos corporales presentan características distintivas que se pueden considerar firmas distintivas las cuales pueden aprovecharse para la identificación y discriminación de estos. Estudios han podido identificar paneles específicos de proteínas y péptidos asociados a sangre, semen y saliva, evidenciando diferencias cuantitativas y cualitativas suficientes para poder realizar su clasificación incluso en forma de manchas biológicas. (Zhang et al., 2024) Estos hallazgos respaldan la capacidad de la proteómica como herramienta para superar las limitaciones de especificidad que se observadas en los métodos tradicionales en el ámbito de la identificación de los fluidos corporales.

Investigaciones recientes han explorado la aplicación de la proteómica forense en contextos que simulan condiciones reales de la práctica pericial, como el análisis de muestras usadas en la extracción de ADN, el estudio de mezclas complejas y la evaluación de los efectos de degradación ambiental, Zaarour et al. (2024) destacó que los enfoques basados LC-MS/MS aprovechan fracciones proteicas residuales sin comprometer el análisis genético, lo que presenta una ventaja operativa significativa frente a las pruebas presuntivas que consumen completamente la muestra. (Zaarour et al., 2024). Aún con estos avances, la literatura disponible revela una marcada heterogeneidad metodológica. Los estudios son diferentes ampliamente en los protocolos de la preparación de la muestra, estrategias de la adquisición de datos (proteómica dirigida y no dirigida), criterios de selección de marcadores proteicos y métricas utilizadas para la evaluación del desempeño analítico. Esta diferencia entre estudios dificulta la comparación directa entre trabajos, limita la reproducibilidad interlaboratorio y plantea desafíos para la estandarización de métodos que puedan llegar a ser implementados de forma rutinaria en laboratorios forenses y aceptados en contextos judiciales (Raj T et al., 2025)

Por lo cual, se hace necesaria una revisión sistemática que sintetice la evidencia reciente sobre el uso de la proteómica basada en LC-MS/MS para la identificación de sangre, semen y saliva en el ámbito forense. Una evaluación del panorama de estudios publicados, de las estrategias analíticas empleadas y del desempeño de los marcadores proteicos propuestos permitirá identificar fortalezas, limitaciones y brechas de los estudios, contribuyendo al desarrollo de enfoques más robustos y estandarizados. El objetivo de la presente revisión sistemática es analizar la literatura publicada entre 2020 y 2025 sobre la aplicación de la proteómica mediante LC-MS/MS para la identificación de sangre, semen y saliva en el contexto forense, con énfasis en describir el panorama de estudios disponibles, analizar las estrategias analíticas utilizadas, evaluar el desempeño y la robustez de los métodos.

## 2. METODOLOGÍA

La presente revisión sistemática está diseñada para sintetizar la evidencia científica disponible sobre el uso de la proteómica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la identificación de sangre, semen y saliva en el ámbito forense. La metodología fue estructurada de acuerdo con

los lineamientos establecidos en la guía PRISMA 2020 (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses.) (Page et al., 2021)

El diseño metodológico refleja el propósito del estudio (sintetizar la evidencia reciente), la meta (evaluar el panorama, las estrategias analíticas y el desempeño de LC-MS/MS), el alcance (estudios publicados entre 2020 y 2025 enfocados en sangre, semen y saliva) y los objetivos específicos previamente definidos.

## 2.1 Búsqueda bibliográfica y criterios de inclusión y exclusión

### 2.1.1 Estrategia de búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura científica en bases de datos electrónicas reconocidas por su relevancia en ciencias forenses, químicas y biomédicas. Las bases de datos consultadas fueron:

- PubMed
- ScienceDirect
- Scopus

Estas bases fueron seleccionadas por su amplia cobertura de revistas indexadas en el área de ciencias forenses, espectrometría de masas y proteómica aplicada. La estrategia de búsqueda se construyó a partir de términos controlados y palabras clave relacionadas con la pregunta de investigación, combinadas mediante operadores booleanos (AND/OR). Las palabras clave principales incluyeron:

1. FORENSIC
2. PROTEOMICS
3. LC-MS/MS
4. BLOOD, SEMEN, SALIVA, BODY FLUID

La cadena solo varía en la última conexión la cual comprende el ámbito del fluido corporal. Como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1 Cadenas de búsquedas usadas en las bases de datos

Fluido corporal	Cadena
Sangre	Forensic AND Proteomics AND LC-MS/MS AND blood
Semen	Forensic AND Proteomics AND LC-MS/MS AND semen
Salivo	Forensic AND Proteomics AND LC-MS/MS AND Saliva
Body Fluid	Forensic AND Proteomics AND LC-MS/MS AND Body Fluid

Fuente: Elaboración Propia

Las búsquedas se limitaron a estudios publicados entre enero de 2020 y diciembre de 2025, con el objetivo de incluir únicamente evidencia reciente y metodológicamente actualizada. Asimismo, se restringió la búsqueda a artículos publicados en idioma inglés y español.

### 2.1.2 Selección de estudios y proceso PRISMA

El proceso de selección de los estudios se llevó a cabo en varias etapas, siguiendo el diagrama de flujo PRISMA 2020 (Page et al., 2021), como también se usó como apoyo la plataforma Rayyan (Ouzzani et al., 2016):

- Identificación: se recopilaron todos los registros obtenidos de las bases de datos seleccionadas.
- Eliminación de duplicados: los registros duplicados fueron identificados y eliminados.
- Cribado por título y resumen: se evaluó la pertinencia de los estudios con base en la pregunta de investigación.
- Evaluación de texto completo: se revisaron los artículos completos para verificar el cumplimiento de los criterios de inclusión.
- Inclusión final: se seleccionaron los estudios que cumplieron todos los criterios establecidos.

El número total de artículos identificados, excluidos e incluidos se reporta mediante un diagrama PRISMA. (Ilustración 1)

### 2.1.3 Criterios de inclusión

Se incluyeron en la revisión aquellos estudios que cumplieron con los siguientes criterios:

- Artículos originales de investigación (experimentales, de desarrollo o validación de métodos).
- Publicados entre 2020 y 2025.
- Escritos en idioma inglés y español
- Aplicación de LC-MS/MS para análisis proteómico.
- Estudios enfocados en la identificación o discriminación de sangre, semen y/o saliva.
- Relevancia forense explícita, incluyendo análisis de manchas biológicas, mezclas, muestras degradadas o escenarios compatibles con la práctica pericial.
- Disponibilidad de texto completo.

### 2.1.4 Criterios de exclusión

Se excluyeron los estudios que presentaron alguna de las siguientes características:

- Revisiones narrativas, revisiones sistemáticas, editoriales, cartas al editor o resúmenes de congresos.
- Estudios que no utilizaran LC-MS/MS (por ejemplo, MALDI-TOF MS, inmunoensayos u otras técnicas no basadas en LC-MS/MS).
- Investigaciones de carácter puramente clínico o biomédico sin posibles aplicaciones forenses.
- Estudios que analizaran fluidos distintos a sangre, semen o saliva sin posibilidad de separar resultados.
- Artículos con información metodológica insuficiente para la extracción de datos relevantes.

### 2.1.5 Extracción de datos

La extracción de datos se realizó de forma sistemática mediante una tabla estandarizada diseñada previamente. Para cada estudio incluido se recopilaron las siguientes variables:

- Autor y año de publicación.
- Tipo de fluido corporal analizado (sangre, semen, saliva).
- Tipo de muestra (líquida o mancha biológica).
- Estrategia proteómica empleada (enfoque dirigido o no dirigido).
- Configuración analítica de LC-MS/MS.
- Métricas de desempeño analítico (exactitud, sensibilidad, especificidad u otras).
- Principales limitaciones reportadas por los autores.

### 2.1.6 Evaluación de Calidad de estudios

La evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos se realizó con el objetivo de analizarla robustez, reproducibilidad y validez analítica de los diferentes métodos. Cabe aclarar que la evaluación no tuvo como objetivo la exclusión de los artículos incluidos, si no como una herramienta de carácter descriptivo para poder contextualizar la solidez de la metodología de la evidencia incluida. El Checklist (Suplemento S1) que se usó fue adaptado con el fin de tener en cuenta aspectos que se esperaban de los artículos incluidos, como también se tuvo en cuenta diferentes aspectos de lineamientos entre ellos MIAPE y SWGTOX (SWGTOX, 2013; Taylor et al., 2007)

Los Dominios Evaluados Fueron Diseño metodológico, Muestra y preparación de muestra, Plataforma LC-MS/MS, Identificación proteica, Marcadores Proteicos y desempeño analítico y robustez y reproducibilidad.

Como niveles de calidad se tuvieron en cuenta: Alta calidad metodológica:  $\geq 80\%$  , Calidad moderada: 50–79 % y Baja calidad metodológica:  $< 50\%$ .

### 2.1.7 Método de síntesis

La información extraída fue utilizada para realizar una síntesis descriptiva de los estudios incluidos, en concordancia con los objetivos de la revisión.

### 3. DESARROLLO Y DISCUSIÓN

#### Resultados

##### Identificación y selección.

Tras la búsqueda sistemática en PubMed, ScienceDirect y Scopus se identificaron 779 registros; posteriormente, se eliminaron 352 duplicados, quedando 427 registros únicos para la fase de cribado. Durante la revisión de títulos y resúmenes se excluyeron 407 registros, principalmente por corresponder a revisiones (incluidas revisiones sistemáticas), por no estar relacionados con el objetivo de la revisión o por tratarse de documentos no elegibles (p. ej., secciones de libro e índices), lo que permitió que 20 registros avanzaran a la evaluación en texto completo. De estos, 6 no pudieron analizarse por falta de acceso al texto completo, por lo que se revisaron 14 artículos de manera íntegra para la selección final, de los cuales 6 cumplieron los criterios de inclusión y fueron incorporados en la revisión. Los 8 artículos excluidos en esta etapa final se descartaron por no abordar la identificación de fluidos (n=5), no presentar un enfoque proteómico (n=1), carecer de orientación forense (n=1) o no estar disponibles en inglés o español (n=1); la Ilustración 1 resume el diagrama de flujo PRISMA y la distribución de registros en cada fase.

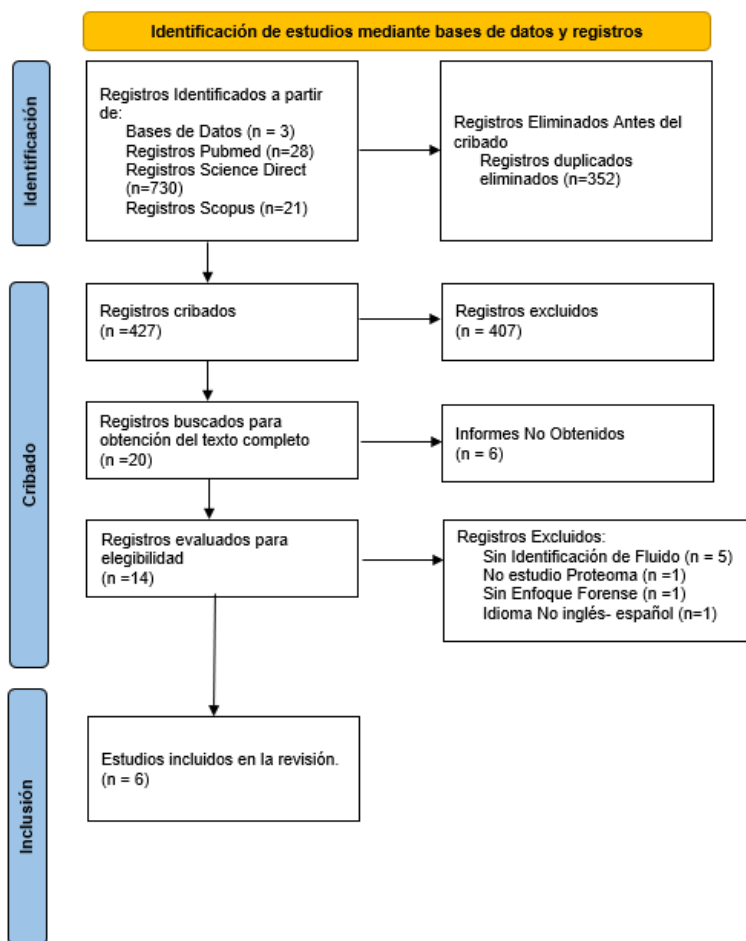


Ilustración 1. Diagrama de flujo PRISMA selección de estudios  
Fuente: elaboración propia, basada en PRISMA 2020 (Page et al., 2021).

## Características Generales de los estudios Incluidos

Se incluyeron seis estudios publicados entre 2021 y 2025 que evaluaron la aplicación de la proteómica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la identificación de fluidos corporales en el ámbito forense. Todos los trabajos correspondieron a estudios experimentales originales orientados al desarrollo, evaluación o validación de métodos analíticos con relevancia pericial (Davidovics et al., 2022; Iyengar et al., 2025; McKiernan et al., 2021; Shehata et al., 2025; Wang et al., 2025; Zaarour et al., 2024). Los estudios analizaron principalmente sangre, semen y saliva, fluidos que constituyen el foco de la presente revisión. No obstante, algunos trabajos incorporaron adicionalmente otros fluidos corporales, como fluido vaginal, sangre menstrual u orina, con fines comparativos o metodológicos, particularmente para evaluar la especificidad de los marcadores proteicos y la capacidad discriminatoria de los enfoques basados en LC-MS/MS frente a fluidos con perfiles proteómicos parcialmente solapados (McKiernan et al., 2021; Shehata et al., 2025; Wang et al., 2025). Los diseños experimentales incluyeron escenarios compatibles con la práctica forense real, tales como manchas biológicas secas, mezclas de fluidos, muestras envejecidas y residuos proteicos posteriores a la extracción de ADN, lo que permitió evaluar el desempeño de LC-MS/MS bajo condiciones representativas del análisis pericial (Iyengar et al., 2025; Zaarour et al., 2024). Las características generales de los estudios incluidos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2 Características de estudios

Autor (año)	Fluidos analizados	Tipo de muestra	Enfoque proteómico	Plataforma LC-MS/MS	Objetivo principal
McKiernan et al. (2021)	Sangre, semen, saliva, orina, fluido vaginal/menstrual	Fluidos líquidos, manchas secas, mezclas, muestras envejecidas	Dirigido (dMRM)	Nano-LC–Triple cuadrupolo	Validación multiplex para identificación confirmatoria de fluidos
Davidovics et al. (2022)	Semen	Manchas secas, hisopos forenses, mezclas	Dirigido (Immuno-MRM)	LC–Triple cuadrupolo	Identificación ultrasensible de semen
Shehata et al. (2025)	Sangre, semen, saliva, orina, fluido vaginal	Fluidos líquidos, mezclas binarias	No dirigido (DIA)	Orbitrap Exploris	Clasificación multivariante de fluidos
Zaarour et al. (2024)	Sangre, semen, saliva	Manchas secas, residuos post-extracción de ADN	No dirigido (DDA)	Orbitrap Q Exactive	Perfilado proteómico compatible con flujos genéticos
Iyengar et al. (2025)	Sangre, semen, saliva	Manchas secas de volumen traza	No dirigido (Discovery)	Orbitrap Fusion Lumos	Análisis proteómico en evidencia traza

Wang et al. (2025)	Sangre, sangre menstrual, semen, saliva, fluido vaginal	Fluidos líquidos, manchas secas, mezclas	Combinado (DDA/DIA + MRM-HR)	SCIEX TripleTOF 5600	Descubrimiento y validación de marcadores
--------------------	---	--	------------------------------	----------------------	---

*Fuente: Elaboración propia.*

## Evaluación de Calidad

La evaluación de la calidad metodológica permitió contextualizar la evidencia disponible para la revisión. Como se muestra en la Tabla 3, todos los estudios incluidos alcanzaron una clasificación de alta calidad metodológica, con porcentajes de cumplimiento global superiores al 90 %. Este hallazgo sugiere que la literatura reciente en este campo se apoya, en general, en diseños experimentales robustos y en metodologías analíticas adecuadamente documentadas. No obstante, a pesar del alto cumplimiento global, el análisis comparativo reveló ciertas limitaciones recurrentes que merecen discusión

*Tabla 3 Resultado global de la evaluación de la calidad metodológica de los estudios incluidos*

Artículo	Cumplimiento metodológico global (%)	Clasificación de calidad
Iyengar et al., 2025	92%	Alta
Davidovics et al., 2022	94%	Alta
Shehata et al., 2025	94%	Alta
McKiernan et al., 2021	98%	Alta
Wang et al., 2025	96%	Alta
Zaarour et al., 2024	96%	Alta

Nota: Cumplimiento por cada dominio se pueden encontrar en resultados globales (Suplemento S2)

*Fuente: Elaboración propia.*

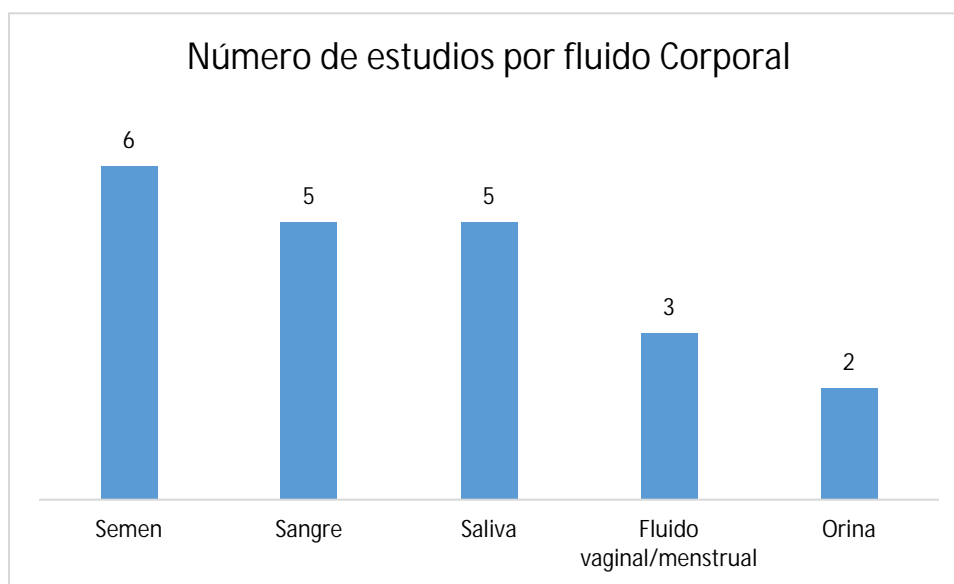
## Fluidos corporales y tipos de muestras analizadas

Todos los estudios evaluaron al menos uno de los tres fluidos corporales de interés principal de esta revisión: sangre, semen y saliva. El semen fue el fluido más consistentemente analizado, seguido por la sangre y la saliva, reflejando su alta relevancia en el contexto de la investigación forense, particularmente en delitos de carácter violento y sexual (McKiernan et al., 2021; Davidovics et al., 2022).

Algunos estudios ampliaron el análisis a fluido vaginal, sangre menstrual y orina, principalmente para evaluar la especificidad de los métodos y la capacidad de discriminación frente a fluidos biológicamente relacionados (Shehata et al., 2025; Wang et al., 2025) En cuanto al tipo de muestra, el análisis de manchas biológicas secas depositadas predominó sobre distintos sustratos, así como el uso de hisopos forenses vaginales, bucales y cutáneos. Asimismo, varios trabajos incluyeron mezclas binarias de fluidos, muestras envejecidas y muestras contaminadas con sustancias exógenas, lo que permitió evaluar el desempeño de LC-MS/MS en condiciones cercanas a la práctica pericial real (McKiernan et al., 2021; Zaarour et al., 2024)

La distribución de los fluidos corporales analizados en los estudios incluidos se muestra en la Ilustración 2.

Ilustración 2 Distribución de los fluidos corporales analizados en los estudios incluidos



### Estrategias Proteómicas y configuraciones de los métodos.

Los estudios incluidos emplearon dos estrategias proteómicas: enfoque dirigido y enfoque no dirigido, además de un enfoque combinado que integró ambas aproximaciones. Estas estrategias determinaron la configuración instrumental de LC-MS/MS y el tipo de información analítica obtenida. Los enfoques dirigidos fueron utilizados en los estudios de McKiernan et al. (2021) y Davidovics et al. (2022) en los cuales la identificación de fluidos corporales se basó en la detección selectiva de péptidos previamente definidos mediante LC-MS/MS acoplado a espectrómetros de triple cuadrupolo, operados en modos MRM, dMRM o inmuno-MRM. Estas configuraciones permitieron un monitoreo altamente específico de transiciones peptídicas asociadas a proteínas características de cada fluido, con énfasis en la sensibilidad, la reproducibilidad y la validación confirmatoria del método.

En contraste, los enfoques no dirigidos fueron empleados por Shehata et al. (2025), Zaarour et al. (2024) e Iyengar et al. (2025). Estos estudios utilizaron plataformas de alta resolución como el Orbitrap, acopladas a LC-MS/MS mediante adquisiciones DDA o DIA, con el objetivo de realizar un análisis global del proteoma sin una selección previa de marcadores. Este enfoque permitió identificar cientos a miles de proteínas y explorar patrones proteómicos discriminatorios entre fluidos corporales, aunque con mayor dependencia de herramientas bioinformáticas avanzadas y menor énfasis en métricas analíticas clásicas.

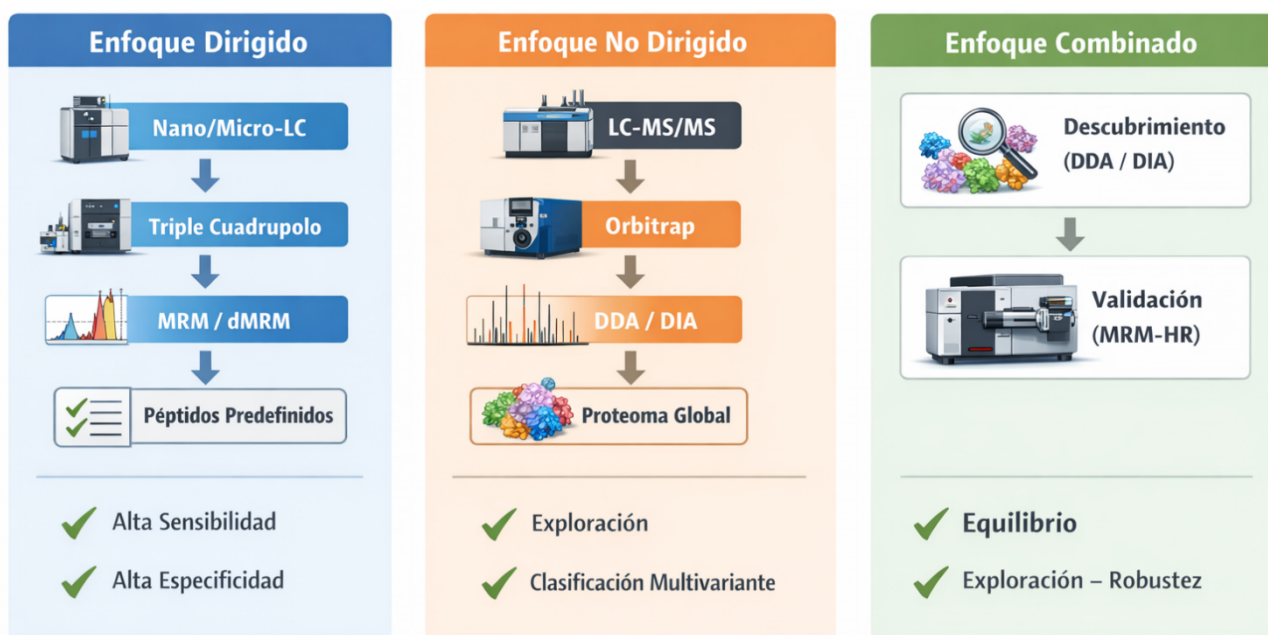
Adicionalmente, Wang et al. (2025) adoptaron un enfoque combinado, integrando proteómica no dirigida para el descubrimiento de marcadores con una etapa posterior de validación dirigida mediante MRM-HR, lo que permitió equilibrar la capacidad exploratoria del análisis global con la robustez analítica propia de los métodos dirigidos. La Tabla 4 resume las estrategias proteómicas y configuraciones instrumentales empleadas, mientras que la Ilustración 3 presenta un esquema comparativo de los enfoques dirigidos, no dirigidos y combinados.

Tabla 4 Estrategias Proteómicas y configuración instrumental de LC-MS/MS

Enfoque proteómico	Estudios	Tipo de adquisición	Plataforma	Propósito analítico
Dirigido	McKiernan et al. (2021); Davidovics et al. (2022)	MRM / dMRM / Immuno-MRM	Triple cuadrupolo	Confirmación, alta sensibilidad y especificidad
No dirigido	Shehata et al. (2025); Zaarour et al. (2024); Iyengar et al. (2025)	DDA / DIA	Orbitrap	Exploración proteómica y clasificación global
Combinado	Wang et al. (2025)	DDA/DIA + MRM-HR	TripleTOF	Descubrimiento y validación de marcadores

Fuente: Elaboración Propia

Ilustración 3 Esquema conceptual del flujo de trabajo/estrategia analítica descrita en esta revisión.



Fuente: Ilustración generada con apoyo de inteligencia artificial generativa con fines gráficos y posteriormente revisada y ajustada por el autor.

### Desempeño analítico reportado por estudio

El desempeño analítico de los métodos LC-MS/MS mostró una heterogeneidad marcada entre los estudios incluidos, estrechamente relacionada con el enfoque proteómico empleado y con el objetivo específico de cada trabajo. La Tabla 5 presenta, para cada estudio, las métricas de sensibilidad, especificidad y las principales limitaciones reportadas por los autores.

Los estudios con enfoques dirigidos reportaron límites de detección claramente definidos y altos niveles de especificidad. McKiernan et al. (2021) informaron límites de detección de ordenes de medida  $10^{-4}$   $\mu$ L para sangre y semen, con valores superiores para saliva y orina. Como también, Davidovics et al. (2022) reportaron una sensibilidad aproximada de 0.0001  $\mu$ L de semen y una especificidad del 100 %, sin detección cruzada con otros fluidos corporales.

Por otro lado, los estudios basados en enfoques no dirigidos priorizaron métricas de clasificación global y exploración proteómica. Shehata et al. (2025) reportaron una exactitud de clasificación global entre 65 % y 75 % en escenarios de mezcla, con un desempeño particularmente elevado para saliva. Zaarour et al. (2024) e Iyengar

et al. (2025) mostraron un desempeño cualitativo para la identificación de fluidos en muestras puras y con volúmenes traza, aunque no reportaron límites de detección numéricos ni métricas de especificidad. Y, por último, Wang et al. (2025), mediante un enfoque combinado, reportaron la identificación correcta del 100 % de las muestras analizadas, con coeficientes de variación entre 8 % y 14 %, aunque señalaron solapamientos parciales entre sangre menstrual y fluido vaginal.

Tabla 5 Sensibilidad, Especificidad y limitaciones reportadas por cada estudio incluido

Artículo	Fluido(s) evaluado(s)	Sensibilidad reportada	Especificidad reportada	Principales limitaciones
McKiernan et al. (2021)	Sangre, semen, saliva, orina, fluido vaginal/menstrual	Sangre: LOD 0.0001 µL; semen: 0.0031 µL; saliva: 0.0244 µL; vaginal: 0.0488 µL; orina: 0.3906 µL	Alta; fallos ocasionales en orina y semen con lubricantes	Menor sensibilidad en orina; supresión de señal en semen con lubricantes
Davidovics et al. (2022)	Semen	LOD ≈ 0.0001 µL	100 % (sin detección cruzada)	Enfoque limitado a semen; dependencia de anticuerpos
Shehata et al. (2025)	Sangre, semen, saliva, orina, fluido vaginal	Exactitud global 65–75 %; recall saliva 100 % No reporta LOD	Moderada; dependiente del conjunto de entrenamiento	Tamaño muestral reducido; dependencia de donantes
Zaarour et al. (2024)	Sangre, semen, saliva	Sensibilidad cualitativa; detección tras extracción de ADN No Reporta LOD	No cuantificada	Falta de validación formal; desempeño limitado en mezclas
Iyengar et al. (2025)	Sangre, semen, saliva	No reporta LOD	No cuantificada	Método en fase de optimización
Wang et al. (2025)	Sangre, sangre menstrual, semen, saliva, fluido vaginal	Identificación correcta del 100 % de muestras ciegas; CV 8–14 % No reporta LOD	100%	Solapamiento parcial sangre menstrual– fluido vaginal

Fuente: Elaboración Propia

El análisis de los resultados evidenció que el desempeño de LC-MS/MS depende del tipo de fluido corporal evaluado. El semen presentó los valores más altos de sensibilidad y especificidad, seguido por la sangre, mientras que la saliva mostró una mayor variabilidad analítica, especialmente en escenarios de mezcla (McKiernan et al., 2021; Shehata et al., 2025) Los fluidos vaginales y menstruales presentaron mayores desafíos de discriminación debido a similitudes biológicas y proteómicas, particularmente en enfoques no dirigidos (Wang et al., 2025)

## Discusión

Con la evidencia incluida la proteómica por LC–MS/MS se muestra como una plataforma con potencial confirmatorio real en el ámbito de la serología forense, especialmente cuando los ensayos presuntivos o inmunológicos pierden rendimiento por la baja cantidad de la muestra, su degradación, interferentes presentes o mezclas de diferentes fluidos. Este posicionamiento coincide con revisiones recientes que describen el avance del campo desde el “descubrimiento de biomarcadores” a paneles con múltiples variables, flujos de trabajo más eficientes y aplicaciones que buscan integrarse con la estructura analítica actual de la evidencia biológica (Keane et al., 2024; Raj T et al)

Por otro lado, el contraste entre los enfoques dirigidos y los no dirigidos resulta en un determinante para interpretar la utilidad práctica de LC-MS/MS. Los métodos dirigidos se aproximan al principio de un ensayo confirmatorio: paneles predefinidos, criterios de identificación controlados y reportes de desempeño comparables entre corridas, lo que favorece su transferibilidad a rutina. (Davidovics et al., 2022; McKiernan et al., 2021). La validación de los paneles de multianalíticas refuerza que la identificación proteómica de los fluidos puede estructurarse como

metodología y no solo como descubrimiento (McKiernan et al., 2021). A su vez, la automatización y selectividad de la inmunoafinidad que se aplicaron a semen sugieren que la productividad puede aumentar sin sacrificar la especificidad cuando el objetivo analítico es ampliamente informativo y el flujo diseñado con una correcta orientación. Por su parte, los Enfoques no dirigidos maximizan el componente exploratorio y la capacidad de una clasificación global, ampliando la biblioteca de proteínas discriminantes. (Keane et al., 2024; Shehata et al., 2025) En términos de robustez bajo condiciones forenses, la evidencia revisada sugiere que el principal reto no se reduce a “detectar un marcador”, sino a sostener su veracidad en presencia de mezclas, sustratos diversos, contaminantes, degradación y/o extracción previa de ADN.

En esta revisión se observó que el semen tiende a exhibir un desempeño particularmente sólido, asociado a proteínas de alta especificidad y abundancia que favorecen reglas de decisión más estables, tanto en ensayos multiplexados como en flujos inmunoafinidad-LC-MS/MS (McKiernan et al., 2021; Davidovics et al., 2022). En cambio, la saliva muestra mayor variabilidad biológica y analítica, y en mezclas se intensifica el problema de dominancia de señales altamente abundantes como la sangre, lo que vuelve importante el preprocesamiento, la adquisición y el enfoque de interpretación (Shehata et al., 2025) En esta línea, trabajos recientes fuera del conjunto incluido han resaltado la complementariedad entre estrategias (biomarcadores peptídicos, relaciones de abundancia y modelos de aprendizaje automático) para mejorar la resolución en mezclas, reforzando que “un único criterio” rara vez cubre todos los escenarios operativos (Rosenberg A et al., 2025)

Particularmente relevante del periodo revisado es el énfasis en maximizar la información extraída de una misma traza biológica, aspecto con impacto directo en la cadena de custodia y en la conservación de evidencia. La demostración de que el remanente no-ADN posterior a la extracción puede usarse para identificar fluidos mediante marcadores peptídicos aporta una vía pragmática para integrar proteómica sin aumentar el consumo de muestra en laboratorios donde la prioridad inicial suele ser el perfil genético (Zaarour et al., 2024)

En cuanto a limitaciones, la presente revisión está condicionada por una cantidad de evidencia reducida y heterogénea en tipos de muestra, preparación, adquisición y forma de reportar desempeño, lo que dificulta comparaciones cuantitativas directas. Adicionalmente, una parte de los estudios aún se sitúa en niveles de prueba de concepto o validación bajo condiciones controladas, sin capturar plenamente la variabilidad preanalítica del caso real (sustratos, ambientes, tiempos de depósito, depósitos). Aunque la revisión se condujo bajo PRISMA 2020, la literatura primaria en proteómica forense no adopta de forma uniforme estándares mínimos de reporte, lo cual limita reproducibilidad e interpretación cruzada (Page et al., 2021; Taylor et al., 2007).

La evidencia disponible nos sugiere tres enfoques para el alcance del campo forense, Primero avanzar hacia una la estandarización como método, no necesariamente un único método universal, pero sí un conjunto mínimo comparable (panel base, controles internos, criterios de identificación y reporte) que habilite validación Inter laboratorio y evaluación bajo ambientes realistas (Keane et al., 2024; Raj T et al., 2025). segundo, el fortalecer estudios de mezclas y baja cantidad de muestra con diseños que separen entrenamiento o validación, transparenten decisiones bioinformáticas y reporten desempeño de forma estandarizada, especialmente cuando se emplean enfoques multivariados o aprendizaje automático (Shehata et al., 2025; Rosenberg et al., 2025). Por último, es importante la profundización de la integración con genética forense mediante estrategias post-extracción o multianálito, reduciendo así el consumo de la evidencia y fortaleciendo inferencias, siempre con evaluación sistemática de incertidumbre y límites de aplicabilidad (Iyengar et al., 2025; Zaarour et al., 2024; Shehata et al., 2025).

En conjunto, la dirección del campo sugiere que LC-MS/MS no solo aporta identificación de fluidos, sino que se está posicionando como un componente integrable de la evidencia biológica moderna; el desafío inmediato es consolidar validaciones reproducibles, comparables y defendibles en contextos judiciales (Keane et al., 2024; Raj T et al., 2025).

#### **4. CONCLUSIONES**

En esta revisión sistemática (2020–2025), la evidencia disponible confirma que la proteómica basada en LC-MS/MS tiene alta relevancia para la ciencia forense como enfoque confirmatorio y de amplio espectro para la identificación de sangre, semen y saliva, especialmente cuando la evidencia es limitada, degradada o presenta

interferentes. Los hallazgos sugieren que su valor no depende solo del equipo, sino de la selección de biomarcadores y de reglas de decisión reproducibles (criterios de identificación, controles y umbrales), lo que define su robustez y transferibilidad al contexto de laboratorio forense.

Como consecuencia principal, la LC-MS/MS se perfila como una herramienta complementaria a las técnicas serológicas, con potencial para integrarse a flujos de trabajo donde se maximiza la información de una misma muestra.

A partir de las inferencias de la revisión, se proponen tres líneas concretas para investigación futura:

- Validar paneles mínimos de péptidos/proteínas específicas por fluido con criterios armonizados e Inter laboratorio.
- Evaluar de forma sistemática el desempeño en mezclas, matrices complejas y escenarios similares a casos reales usando diseños comparables y métricas estandarizadas.
- Explorar hipótesis de atribución más fina de fuente biológica mediante marcadores avanzados (p. Ej., perfiles multiclase o variantes de aminoácidos), siempre acompañadas de validación externa.

En conjunto, la evidencia revisada indica que el campo está en transición desde pruebas de concepto hacia aplicaciones operativas, y que el siguiente paso crítico es consolidar estándares de reporte y validación que permitan una adopción rutinaria con interpretaciones transparentes y defendibles.

## 5. AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a todas las personas que me brindaron su apoyo durante mi formación académica. De manera especial, agradezco a mi familia por su respaldo constante y a mi pareja por su valiosa colaboración y apoyo fundamental en la culminación de este proceso

## 6. DECLARACION DEL USO DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL

Los autores declaran que emplearon herramientas digitales como apoyo en fases específicas del desarrollo del manuscrito. En primer lugar, se utilizó la plataforma Rayyan para gestionar el proceso de tamizaje y selección de estudios durante las fases del diagrama PRISMA (p. ej., organización de registros, apoyo en cribado por título/resumen y revisión a texto completo, y trazabilidad de decisiones). En segundo lugar, se utilizó inteligencia artificial generativa para la generación de la Ilustración 3, con fines exclusivamente gráficos y de representación conceptual; dicha ilustración no corresponde a datos experimentales ni altera resultados, y la versión final fue revisada y validada por los autores. Finalmente, se empleó inteligencia artificial como apoyo exclusivamente para mejorar redacción, claridad, coherencia y corrección de estilo del texto. La IA no se utilizó para generar datos, modificar resultados, ni sustituir el juicio académico.

## 7. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Davidovics, R., Saw, Y. L., Brown, C. O., Prinz, M., McKiernan, H. E., Danielson, P. B., & Legg, K. M. (2022). High-throughput seminal fluid identification by automated immunoaffinity mass spectrometry. *Journal of Forensic Sciences*, 67(3), 1184-1190. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14975>
- Iyengar, A., Hetzke, J., Smith, C., Chadwick, C., Rishel, M., Nelson, J., & Davis, B. (2025). Technical Note: A novel method for simultaneous recovery of DNA, RNA, and proteins from trace biological samples for forensic application. *Forensic Science International*, 377, 112665. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2025.112665>
- Keane, R. E., Tidy, R. J., Parker, G. J., Gummer, J. P. A., & Priddis, C. (2024). Mass spectrometry-based proteomics: Changing the impact of protein analysis in forensic science. *WIREs Forensic Science*, 6(4), e1516. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1516>
- McKiernan, H. E., Danielson, P. B., Brown, C. O., Signaevsky, M., Westring, C. G., & Legg, K. M. (2021). Developmental validation of a multiplex proteomic assay for the identification of forensically relevant biological fluids. *Forensic Science International*, 326, 110908. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110908>

- Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z., & Elmagarmid, A. (2016). Rayyan—A web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*, 5(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Alonso-Fernández, S. (2021). Declaración PRISMA 2020: Una guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas. *Revista Española de Cardiología*, 74(9), 790-799. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2021.06.016>
- Parker, G. J., McKiernan, H. E., Legg, K. M., & Goecker, Z. C. (2021). Forensic proteomics. *Forensic Science International: Genetics*, 54, 102529. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102529>
- Raj T, A., G.B., A., M, A., & E. M., A. (2025). Mass spectrometry-based proteomics in forensic investigations: A focused review of LC-MS applications. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 15(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s41935-025-00484-8>
- Rosenberg A, S, L., E, M., A, M., & J, V. (2025). The Identification of Biological Stains at Crime Scenes: A Promising Role for Proteomics and Machine Learning. *Analytical Chemistry*, 97(40). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5c01795>
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. (2013). *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452-474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>
- Shehata, T. P., Alex, S., Van Lierop, S. N. C., Blom, M. J., Van De Wetering -Tieleman, J., Prust, N., Demmers, J., & De Puit, M. (2025). An Integrated proteomic workflow for body fluid classification and single amino acid variant identification: Advancing towards body fluid source attribution. *Forensic Science International: Genetics*, 81, 103343. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2025.103343>
- Taylor, C. F., Paton, N. W., Lilley, K. S., Binz, P.-A., & Et., A. (2007). The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt1329>
- Wang, Z., Wang, S., Liu, X., Shi, H., Zhang, W., Yang, Z., Feng, L., Ji, A., Liang, Z., Liu, J., Zhang, L., & Zhang, Y. (2025). Discovery of specific protein markers in multiple body fluids and their application in forensic science. *Talanta*, 293, 128032. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2025.128032>
- Zaarour, L., Padula, M., Van Oorschot, R. A. H., & McNevin, D. (2024). Mass spectrometry-based proteomics for source-level attribution after DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics*, 74, 103168. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2024.103168>
- Zhang, J., Yan, M., Ji, A., Sun, Q., & Ying, W. (2024). Mass spectrometry-based proteomic analysis of biological stains identifies body fluids specific markers. *Forensic Science International*, 357, 112008. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2024.112008>