

DIFERENTES METODOLOGÍAS DE UTILIDAD EN EL CAMPO DE LA GENÉTICA FORENSE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FLUIDO SEMINAL.

DIFFERENT METHODOLOGIES USEFUL IN THE FIELD OF FORENSIC GENETICS FOR THE IDENTIFICATION OF SEMINAL FLUID.

MUÑIZ McALEER C.¹, LAREU HUIDOBRO M.V.², DE LA PUENTE VILA M.C.², REMEDIOS TATO S.¹, RAMOS BLANCOA.¹

RESUMEN.

En genética forense, la determinación de la presencia de fluidos biológicos resultar totalmente determinante en ciertas investigaciones, aportando información de utilidad para la reconstrucción de los hechos y el esclarecimiento de la verdad. Dentro de los fluidos biológicos más frecuentes destacan los siguientes: sangre, saliva, orina, sudor, semen y fluido vaginal. La genética forense es una ciencia que está experimentando grandes avances en los últimos años gracias al uso de nuevas metodologías que se aplican a la detección de fluido seminal. A pesar de que las técnicas inmunocromatográficas siguen siendo ampliamente utilizadas, las nuevas tendencias se inclinan hacia el estudio de metodologías basadas en la biología molecular, especialmente las de ARN mensajero. Aunque existen técnicas bastante seguras para la detección de fluido seminal, se debe seguir investigando ya que aún hay que superar desafíos tales como la correcta interpretación en el contexto forense de pruebas contaminadas o cruzadas.

PALABRAS CLAVE: GENÉTICA FORENSE, FLUIDO SEMINAL, METODOLOGÍAS DE DETECCIÓN, ANÁLISIS PRELIMINARES.

ABSTRACT.

In forensic genetics, the determination of the presence of biological fluids is crucial in certain investigations, providing valuable information for the reconstruction of events and the clarification of the truth. Among the most common biological fluids are blood, saliva, urine, sweat, semen, and vaginal fluid. Forensic genetics is a science that has been experiencing significant advancements in recent years, thanks to the use of new methodologies applied to the detection of seminal fluid. Although immunochromatographic techniques are still widely used, new trends lean towards the study of methodologies based on molecular biology, particularly those involving mRNA. While there are quite reliable techniques for the detection of seminal fluid, further research is needed as challenges such as the proper interpretation in the forensic context of contaminated or cross-contaminated evidence still need to be overcome.

KEY WORDS: FORENSIC GENETICS, SEMINAL FLUID, DETECTION METHODOLOGIES, PRELIMINARY ANALYSIS.

CONTACTO: Carla Muñiz McAleer, Email: carla_mm_@hotmail.com

1. INTRODUCCIÓN.

Se define como fluido biológico cualquier secreción producida por nuestro organismo. Los que habitualmente se pueden encontrar en las escenas de crimen son: sangre, saliva, orina, sudor, semen y fluido vaginal (4). Dichos fluidos contienen ADN que se puede analizar para la determinación de un perfil genético de STRs identificativo. Pero, además, la presencia o ausencia de un fluido biológico en concreto puede resultar totalmente determinante en ciertas investigaciones, aportando información de utilidad para la reconstrucción de los hechos y el esclarecimiento de la verdad. Sirven para

establecer un enlace entre el dueño de la muestra, el tipo de células que se hallan y los acontecimientos que se produjeron(6)

La identificación del fluido biológico es una tarea que entraña complejidad ya que no siempre podemos localizar los fluidos a simple vista, no resulta fácil determinar de qué tipo son a simple vista. Además, en caso de que la muestra sea escasa, lo que suele ocurrir en el ámbito de la genética forense, el perito deberá decidir que análisis priorizar, ya que usualmente cada fluido requiere de un análisis independiente. Así, los principales métodos que utilizamos en la actualidad son test químicos, inmunológicos, de

1. Graduada en Medicina.

2. Instituto de Ciencias Forenses Luis Concheiro. Universidad de Santiago de Compostela.

la actividad catalítica de las proteínas, métodos espectroscópicos y microscopía (7). Otro problema es la preservación del ADN durante la realización de los análisis preliminares, de ahí que en la detección se prioricen usen técnicas seguras, rápidas y no destructivas con la muestra(8).

En este trabajo se revisarán en profundidad los métodos empleados para detectar el fluido seminal. Su importancia radica en que el semen es el fluido biológico más frecuentemente localizado en los crímenes de tipo sexual.

BIOQUÍMICA DEL SEMEN: El semen es un fluido producido por el aparato reproductivo masculino. Es de color blanco, viscoso y con un pH ligeramente alcalino. Está compuesto por el plasma seminal y los espermatozoides. Cuando está fresco, tiene un olor muy identificativo y cuando está seco deja unas manchas que pueden ser de color entre amarillo y gris(9).

Los espermatozoides se originan en las células germinales de los túbulos seminíferos. Se originan en un proceso denominado espermatogénesis de unos 60 días de duración, aproximadamente, y tienen un tamaño de unos 60 μm de longitud. Están divididos en tres partes diferenciadas:

- Cabeza, compuesta por el acrosoma (encargado de facilitar la fecundación gracias a las enzimas presentes en su interior) y el núcleo (que contiene la información genética).
- Cuello o pieza intermedia, zona de vital importancia ya que es donde están las mitocondrias, fuente de energía que permite el movimiento del espermatozoide.
- Flagelo o cola, estructura filiforme de 50 μm cuya principal función es la movilidad(10).

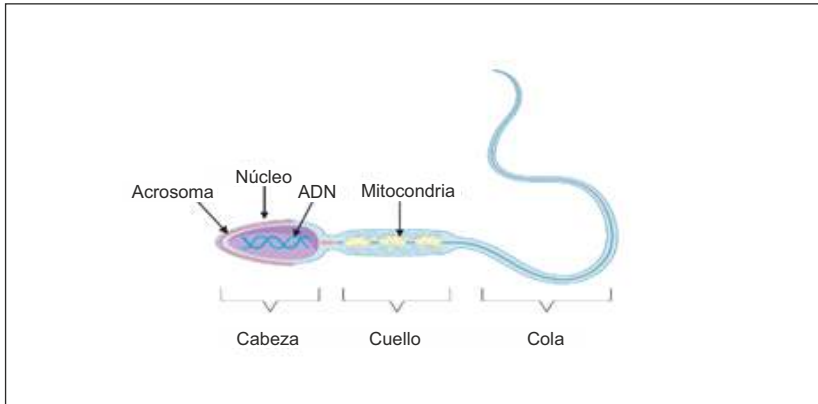


Figura 1. Esquema de cada una de las partes principales de un espermatozoide (Imagen creada con BioRender).

Por otra parte, el plasma seminal conforma la parte fluida del semen y sirve como vehículo para los espermatozoides, además de aportarles protección y nutrición. Se forma gracias a fluidos procedentes de los testículos, epidídimo, vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales. Está compuesto por una gran variedad de sustancias, destacando:

- Fructosa, principal fuente de energía para los espermatozoides.
- Ácido cítrico, que sirve para que se mantengan las condiciones de presión osmótica.
- Zinc, bactericida.

- Magnesio.
- Calicreína 3 o antígeno prostático específico (PSA).
- Fosfatasa ácida(11).

Teniendo en cuenta esta definición, distinguimos el semen del líquido preseminal. El segundo es secretado por las glándulas de Littre del aparato reproductor masculino y tiene una proporción en número de espermatozoides mucho menor. Su única función es lubricar las paredes de la uretra para después poder facilitar la expulsión del eyaculado(12).

2. OBJETIVOS.

El primer objetivo del trabajo es clasificar y describir las características, criterios de aplicación y ventajas y limitaciones las diferentes metodologías para la identificación de fluido seminal en el contexto de la genética forense.

El segundo objetivo de este trabajo es analizar las tendencias actuales en investigación para la identificación de fluido seminal en el contexto de la genética forense.

3. METODOLOGÍA.

En función de los objetivos descritos en el apartado anterior se realizaron dos búsquedas principales:

Primer objetivo: descripción y clasificación de las diferentes metodologías para la identificación de fluido seminal en el contexto de la genética forense. Para ello se realizaron dos búsquedas bibliográficas entre los meses de abril y mayo de 2023 y se identificaron las fuentes bibliográficas utilizando la base de datos de PubMed.

- A los resultados se le aplicaron los siguientes filtros a través del propio motor de búsqueda de PubMed:

- Tipo de estudio: revisión y revisión sistemática.
- Resumen disponible.
- Texto final publicado.
- Publicados en los últimos 10 años.
- Idiomas: español o inglés.
- Estudios en humanos.

- Posteriormente, se realizó un segundo filtrado de las referencias, tras la lectura del resumen por parte del analista, aplicando los siguientes criterios:

- Relevantes para la temática.
- Artículo disponible para estudiantes de la USC o de acceso gratuito universal.

La primera búsqueda se llevó a cabo utilizando las palabras clave: “*body*”, “*fluid*”, “*identification*” y “*forensic*”. En la búsqueda inicial se encontraron 18 artículos. Tras el análisis de los resúmenes se descartaron 6 artículos por no ceñirse a la temática del estudio o no hallarse disponibles. El resultado final fue la inclusión de 12 artículos.

La segunda búsqueda, más genérica, se llevó a cabo utilizando las palabras clave: “*semen*” y “*forensic*”. En la búsqueda inicial se encontraron 11 artículos, de los que tras el análisis de los resúmenes se descartaron 7 artículos por no ceñirse a la temática del estudio o no hallarse disponibles. El resultado final fue la inclusión de 4 artículos.

Finalmente se comprobó que artículos se solapaban en los resultados de ambas búsquedas, siendo el resultado de 1 coincidencia. De esta manera, el número total de artículos revisados fue de 15.

A partir de estas referencias se han definido las clasificaciones y, cuando fue necesario, se acudió a artículos citados en estas revisiones

para completar las descripciones de las metodologías, así como a la consulta de fuentes online relevantes.

Segundo objetivo: análisis de las tendencias actuales en investigación para la identificación de fluido seminal en el contexto de la genética forense. Para ello se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos de PubMed entre los meses de abril y mayo de 2023.

- A los resultados se le aplicaron los siguientes filtros a través del propio motor de búsqueda de PubMed:
 - Resumen disponible.
 - Texto final publicado.
 - Publicados en los últimos 5 años.
 - Estudios en humanos.
 - Idiomas: español o inglés.
- Posteriormente, se realizó un segundo filtrado de las referencias, tras la lectura del resumen por parte del analista, aplicando los siguientes criterios
 - Relevantes para la temática.
 - Artículo disponible para estudiantes de la USC o de acceso gratuito universal.
 - Presentación de un nuevo ensayo para la detección de semen.

La búsqueda bibliográfica se llevó a cabo utilizando las siguientes palabras clave: “*fluid identification*” y “*semen*”. En la búsqueda inicial se encontraron 61 artículos. Se descartaron 14 artículos por no ceñirse a la temática del estudio o no hallarse disponibles y 11 por no tratarse de nuevos ensayos para la detección de semen. El número final de artículos obtenidos fue de 36.

Dichos artículos fueron analizados para extraer la siguiente información: tipo de metodología, referencia, año, otros fluidos identificados, número de marcadores, número de marcadores

de identificación de semen y enumeración de estos y comentarios sobre la técnica utilizada para el análisis genético.

Los datos recuperados durante la exploración de las bases de datos mencionadas previamente fueron archivados en un repositorio utilizando el software Zotero. En una primera instancia, se llevó a cabo una inspección exhaustiva de todas las entradas con el propósito de eliminar los resultados duplicados. Posteriormente, se procedió a descartar aquellos artículos que no se ajustaban adecuadamente a los criterios de revisión, mientras que se seleccionaron aquellos que se consideraron más pertinentes para el estudio y se incorporaron en una biblioteca común. Por último, se verificó que ninguno de los artículos previamente descartados contuviera información relevante para la presente revisión, lo que condujo a la creación de una biblioteca final. Una vez establecida la biblioteca, se localizaron todos los artículos incluidos con el fin de llevar a cabo su revisión, registro y análisis de datos.

4. DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FLUIDO SEMINAL:

En genética forense, se utilizan dos tipos principales de pruebas para determinar la presencia o ausencia de marcadores genéticos en una muestra y establecer la identidad de un individuo: las pruebas orientativas y las pruebas confirmatorias.

- Test orientativos/presuntivos: son análisis preliminares con una alta sensibilidad que nos ayudan a localizar la mancha, pero es necesario confirmar posteriormente si es semen mediante otro método de identificación que sea confirmatorio, ya que tienden a producir una alta cantidad de falsos positivos. Son pruebas rápidas y menos costosas que las confirmatorias, cuya función es descartar rápidamente aquellas muestras que no coinciden con el perfil genético buscado.

Dentro de este tipo se encuentran el resto de los métodos descritos en el siguiente apartado y que no se mencionan dentro de los test confirmatorios.

- **Test confirmatorios:** permiten afirmar con un alto nivel de certeza que la mancha que se analiza en el proceso de genética forense es realmente semen, por lo que son muy específicos. Estas pruebas suelen ser más complejas y tienen un coste mayor. Se centran en analizar y detectar marcadores genéticos específicos de la muestra. Generalmente se realizan primero los tests presuntivos por su menor coste y si estos resultan positivos es cuando se realiza un test confirmatorio para poder afirmar con seguridad y validar que hay semen en la muestra.

Dentro de estos se encuentran la microscopía, y el de la semenogelina, los cuales se describirán en profundidad en el siguiente apartado.

4.1. BASADOS EN LA VISUALIZACIÓN.

4.1.1. Fuentes de luz alternativas.

Es una prueba de detección rápida basada en fluorescencia, la propiedad de absorber luz de longitud de onda corta y transformarla en luz de longitud de onda larga. Para ello, se utiliza una fuente de luz que emite ondas entre los 310 y 650 nm. El semen tiene un amplio espectro de excitación, ya que cuando se aplica luz UV (ultravioleta) sobre él usando longitudes de onda de entre 300 y 400 nm, sus proteínas y ácidos nucleicos son capaces de excitarse emitiendo fluorescencia, permitiendo de esta manera su visualización.(13).

Este método en ciertos sentidos supone una ventaja sobre los métodos químicos habituales, ya que al ser una prueba portátil permite ahorrar tiempo y además es más fácil de utilizar. Es no invasiva, segura y sencilla. También tiene la capacidad de detectar manchas que no se ven a

simple vista. Por otra parte, la detección de manchas de semen es posible en diferentes tipos de tejido tales como algodón, poliéster, nailon y lana. Incluso se puede identificar fluido seminal en los preservativos.

Una de sus principales limitaciones es que el no encontrar semen en la muestra no excluye la posibilidad de que lo haya. A la inversa, la presencia de fluorescencia, no siempre indica que tenga que estar presente el fluido seminal (14). Además, la capacidad para detectarlo varía dependiendo del color del material. Es más fácil si el fondo sobre el que se observan las manchas es de color blanco. Materiales oscuros y/o muy absorbentes dificultan la precisión de la prueba. Se debe tener en cuenta la posibilidad de que la ropa o los diferentes elementos analizados estén contaminados por otro tipo de sustancias que también emiten fluorescencia (como la orina o detergentes) y podrían llevar a incurrir en falsos positivos.

El uso de gafas de colores (naranja, amarillo, rojo) en combinación con la fuente de luz permite incrementar la posibilidad de distinguir las manchas de semen, debido a que aumentan el contraste y mejoran la visibilidad de la fluorescencia(15).

Hay diferentes tipos de marcas de luces forenses entre las que destacan: Polilight, Bluemaxx BM500, Mineralight y Luxeon. La que mejores resultados ha aportado es la combinación de Polilight con gafas de color naranja ya que es la que detecta el semen en una mayor cantidad de superficies distintas. Por otra parte, Bluemaxx BM500 ha conseguido buenos resultados a la hora de detectar manchas de semen en tela blanca. El resto son inferiores en cuanto a los resultados obtenidos (16).

Como conclusión, las fuentes de luz alternativa son de utilidad cuando se combinan con otros métodos de detección, ya que estas sirven principalmente para localizar las manchas, pero no permiten identificar el fluido con seguridad, por lo que se trataría por lo tanto de un test de tipo orientativo.

4.1.2. Microscopía y tinciones.

Es el *gold* estándar dentro de las técnicas de confirmación. Se basa en la observación directa de los espermatozoides a través del microscopio. Generalmente se suele emplear primero un test de presunción como el de la fosfatasa ácida, y después se comprueba mediante este método.

Principalmente se usa la técnica de tinción llamada “árbol de navidad”, el resultado es positivo si se observa al menos un espermatozoide, negativo si no observas ninguno, y potencialmente positivo si aparecen células con características semejantes a las células espermáticas (17). Su nombre se debe a que las cabezas de los espermatozoides quedan coloreadas de rojo y las colas de verde (8). Para llevar a cabo este proceso, se coloca la muestra en un portaobjetos, se añade el colorante Kernechtrol, que teñirá las cabezas de rojo (también llamado Rojo rápido nuclear), se deja actuar 20 minutos y se lava con agua destilada, posteriormente se añade Pícrico índigo carmín, que teñirá las colas de verde, se deja actuar 10-15 segundos y se aclara con etanol al 95%, tras el secado ya será posible observar los espermatozoides al microscopio.

Otras tinciones empleadas son la hematoxilina-eosina, la de Papanicolau o la de Wright.

Los factores principales que pueden llevar a fallos en esta técnica son la habilidad de observación del investigador, el volumen de espermatozoides que se encuentran en la muestra y el tiempo que ha pasado desde la eyaculación del semen.

También se pueden obtener falsos negativos en el supuesto de que el individuo sea azoospermico tanto por causas naturales como por vasectomía.

Una técnica novedosa dentro de las metodologías de microscopía es el SPERM HY-LITER™. Se trata de una técnica de fluorescencia microscópica, que requiere el uso de un microscopio especializado. Se utiliza un reactivo denominado isotiocianato de fluorosceína verde, que es un anticuerpo

monoclonal que se dirige específicamente frente a antígenos de la membrana celular de los espermatozoides y los tiñe de color fluorescente. Su ventaja es que permite detectar pocas células espermáticas dentro de muestras con grandes cantidades de células vaginales (18).

4.1.3. Espectroscópicos.

Se define la espectroscopia como el estudio de la radiación emitida por la sustancia que tenemos como muestra. Los diferentes tipos de espectroscopia depende de la energía radiante implicada y de su longitud de onda. Para el estudio del semen destaca la espectroscopia Raman y la infrarroja.

La espectroscopia Raman sirve para identificar fluidos de manera no destructiva y es un test confirmatorio que permite obtener los resultados rápidamente (19). Basa su acción en la dispersión inelástica de la radiación procedente de una luz láser de baja intensidad y monocromática (20).

Al principio sólo se estudiaba para detectar sangre con propósitos de aplicación a la clínica, pero en los últimos años han aumentado los estudios sobre su utilidad a la hora de analizar fluidos corporales. Con los avances recientes, se ha conseguido que esta técnica identifique fármacos, fibras, pintalabios e incluso lubricantes de preservativos (lo cuál podría ser útil en algunos casos de violencia sexual).

Sus ventajas son que se necesitan muestras muy pequeñas para el análisis, con picogramos llega, no necesita reactivos ni ningún tipo de pretratamiento, no presenta interferencia con el agua y es capaz de detectar muestras heterogéneas. No es tan sensible como la espectroscopia de fluorescencia, pero si tiene una mayor especificidad y es más selectiva.

En cuanto al análisis del semen mediante esta técnica, el estudio llevado a cabo por Virkler y Lednev demostró que una muestra de semen seco contenía tirosina, colina y fosfato de espermina, lo que nos permite diferenciarlo de otros fluidos biológicos (21).

Actualmente existen espectrómetros de Raman portátiles, que principalmente se usan para identificar explosivos y drogas, pero se prevé que un futuro también puedan ser útiles para el análisis forense de identificación de fluidos(22).

Por otro lado, existe la espectroscopia infrarroja. En el espectro del semen, los componentes principales resultaron ser la albúmina y la fosfatasa ácida, esta última también está presente en fluidos vaginales lo que podría provocar falsos positivos, pero, aunque ambos espectros sean similares tienen las diferencias necesarias para poder distinguirlos. A diferencia de la espectroscopia Raman, esta técnica se lleva utilizando durante décadas de forma rutinaria para el diagnóstico clínico. De todas formas, hay muchos menos estudios sobre esta técnica, así que se necesitan más análisis para determinar de manera certera cual es el espectro de cada fluido corporal(23).

Por último, hay que destacar que una de las que está siendo más estudiadas en la actualidad es la espectrometría de masas. Esta basa su acción en la extracción y digestión de proteínas mediante reactivos químicos consiguiendo la posterior separación e identificación de estas gracias a un láser asistido por matriz. En esta técnica los principales marcadores utilizados para la detección de fluido seminal fueron la semenogelina-1 y la semenogelina-2. Comparando los otros métodos espectroscópicos mencionados anteriormente con la espectrometría de masas, es importante incidir en las desventajas de esta última, ya que se trata de un proceso destructivo y lento (la separación de las proteínas dura al menos 40 minutos)(20).

4.2. BASADOS EN EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS:

Dentro de este grupo destaca el test de la fosfatasa ácida seminal (SAP). La fosfatasa ácida es una fosfomonoesterasa no específica, secretada por la glándula prostática y que se encuentra en grandes cantidades en el fluido seminal. La SAP es una enzima que es capaz de catalizar la hidrólisis de grupos fosfato dando

lugar a un producto que interaccionará con una sal cromógena para lograr el cambio de color. La actividad de la fosfatasa ácida es entre 500 y 1000 veces mayor en el semen que en cualquier otro fluido biológico del organismo humano (7). La fosfatasa ácida seminal puede detectarse en la vagina hasta 72 horas después del coito.

Para su detección se utiliza una prueba química que se basa en la detección de enzimas mediante un estudio del cambio de color de la muestra. Tenemos diferentes tipos de mezcla sustrato/revelador de color, entre ellos la más utilizada es la prueba rápida de la Brentamina (8). Otros métodos son la reacción de alfa-naftol con sal de diazonio (*Fast Red AL*), la beta-naftol con sal de diazonio (*Fast Garnet B*) o la de ZnCl₂ con sal de tetrazolio (*Fast Blue B*)(24).

No sirve como prueba confirmatoria, es un test presuntivo. Después de obtener un resultado positivo en esta prueba (un cambio de color), es necesario confirmarlo mediante otros métodos. Actualmente está comercializado el test del reactivo SM, que se usa en las investigaciones de crímenes sexuales de todo el mundo(9).

Dentro de los inconvenientes de esta técnica cabe destacar los siguientes: es una prueba operador-dependiente, de manera que su eficiencia tendrá relación con la experiencia y habilidad del investigador, además, retrasos en la lectura de la prueba pueden provocar la aparición de falsos positivos, por ello lo ideal es detectar el resultado positivo durante los 5-30 segundos posteriores a la realización de la prueba (25). Otro problema, es que la SAP es una enzima, y como tal, puede degradarse por el calor, moho, productos químicos o putrefacción (8). También es importante destacar que otra fuente de aparición de falsos positivos es la posible confusión de la SAP con la fosfatasa ácida vaginal (VAP), que se genera de forma natural en la vagina a una baja concentración.

Se han empleado otros test de detección de fluido seminal basados en la actividad de otras enzimas como el test de la leucina aminopeptidasa (LAP) o el de la glicilprolina dipeptidasa (GDA), pero ninguno de ellos es tan popular como el test de la SAP.

4.2.1. Inmunocromatográficos.

4.2.1.1. Test del antígeno prostático específico.

El PSA, también conocido como p30, es una glucoproteína de cadena simple cuya función es mantener la licuefacción del semen. Se origina en las glándulas prostáticas y es secretado en el fluido seminal. Sus niveles en plasma varían entre 0.2 y 5.5 µg/L. Habitualmente se usa para la detección y control del cáncer de próstata, debido a que valores superiores a 4 µg/L hacen saltar las alarmas y se debe hacer un cribado para poder tratarlo con precocidad(26).

Se utiliza como prueba presuntiva, ya que tiene ciertas limitaciones. Se encuentra también presente en la leche materna, la orina y el sudor femeninos y es producido por las glándulas periuretrales de las mujeres (9). De todas formas, los niveles suelen estar por debajo del límite de detección de los métodos que se utilizan en la práctica forense de manera que se reducen los falsos positivos. Para el empleo de la PSA en genética forense no es tan importante su detección en niveles absolutos, sino la capacidad de detectarlo en muestras contaminadas, como piezas de ropa lavadas y cadáveres en descomposición, en los que podría encontrarse mezclado con otros fluidos corporales (27).

Una excepción es el hecho de que el PSA se eleva en mujeres que están a tratamiento activo con anticonceptivos orales, sin necesidad de que hayan mantenido relaciones sexuales (28). También se ha detectado un aumento del PSA en un 30% de mujeres que padecen de cáncer de mama, y dentro de estas se asocia más a tumores benignos con receptores de hormonas positivos (29). Por ello es necesario elaborar sistemas con una alta sensibilidad que sean capaces de evitar la obtención de falsos positivos.

Una de las ventajas de su uso es que es posible detectar PSA en individuos azoospermicos y en líquido preseminal(30)

Los ensayos iniciales para la detección de la

PSA se basaban en pruebas de tipo ELISA, sin embargo, en la actualidad se están comercializando kits rápidos basados en reacciones antígeno-anticuerpo como el Biosign PSA test, OneStep ABACard o SERATEC PSA Semiquant que son más sencillos de usar(8).

4.2.1.2. Test de la semenogelina.

La semenogelina es la proteína más abundante del plasma seminal humano y se produce en las vesículas seminales. Está formada por dos compuestos proteicos: semenogelina I (Sg-I) y semenogelina II (Sg-II). Su principal función es ralentizar el proceso de liberación de espermatozoides en el aparato reproductor femenino durante la licuefacción del semen, siendo esto posible al formar un coágulo con el plasma seminal. Este proceso ocurre en los 20 minutos posteriores a la eyaculación, y durante este, se produce la escisión de la semenogelina mediante la PSA, dando lugar a la α -inhibina, al antígeno específico de la vesícula seminal y al inhibidor de la motilidad del plasma seminal (32, 37).

La prueba de detección de la semenogelina es un test inmunocromatográfico y de tipo confirmatorio. Utiliza dos anticuerpos monoclonales específicos para la semenogelina. La forma de utilizar este método es la siguiente: se añade la muestra a la zona de la almohadilla de conjugado, lugar en el que los anticuerpos monoclonales se unen a la semenogelina en caso de que esté presente. Después, difunde hacia la zona de la membrana, que inicialmente no tiene ninguna raya visible. La línea de control indica que el test funciona correctamente, y cuando ambas líneas (tanto test como control) son coloreadas, es un indicador de que la prueba es positiva y que realmente hay semenogelina humana en la muestra. La intensidad de la línea se compara con un patrón de control, para asegurar que no haya mucha variabilidad entre distintos observadores. Finalmente, el fluido se retiene en la mecha. Para obtener unos resultados válidos, debe esperarse 10 minutos tras la adicción de la muestra para interpretar el test(32).

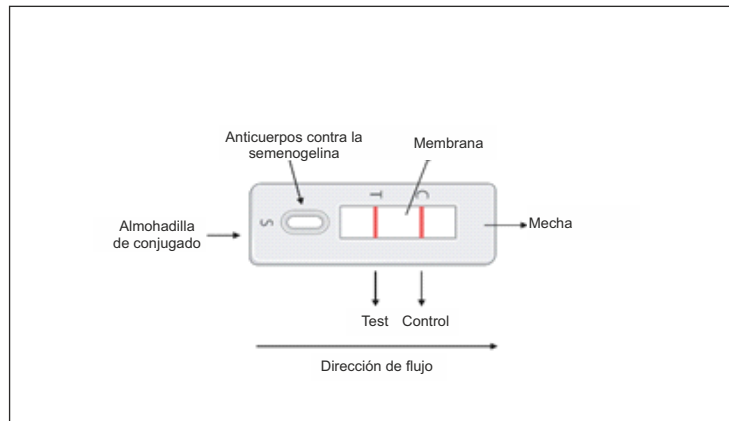


Figura 6. Test de detección de la semenogelina positivo. (Imagen creada con BioRender)

Puede dar falsos positivos, ya que la semenogelina también se encuentra presente en carcinomas, y en otras partes del cuerpo como los riñones, el músculo esquelético, el colon o la retina; aunque generalmente, esto no constituye un problema en un contexto forense. Además, la semenogelina tampoco está relacionada con ninguna enfermedad, a diferencia de la PSA que si se vincula con la hipertrofia y el cáncer de próstata. De esta manera no parece que tenga reacciones cruzadas con otros fluidos corporales humanos (33).

El test comercial más utilizado es el RSID-test (*"Rapid Stain Identification"* = Detección rápida de manchas). En el estudio citado se compara su sensibilidad y especificidad en relación con el test comercial de detección del PSA, ABACard p30. Los dos métodos utilizan la misma técnica de ensayo inmunocromatográfico de membrana. La sensibilidad demostrada por ambos métodos es parecida, siendo la del RSID un poco superior al ser capaz de detectar la semenogelina en diluciones de semen de 1:100000, mientras que el ABACard sólo alcanza diluciones de 1:50000. El ABACard p30 es capaz de detectar cantidades tan bajas de PSA como 4ng/mL, mientras que el RSID-test puede detectar semenogelina cuando la cantidad a analizar es superior a 1 µl de semen(33).

Otro test comercial empleado es el Nanotrap Sg, que tiene una sensibilidad similar al RSID-test. La principal ventaja de este kit es que consiguió demostrar la presencia de semenogelina en el 67% de las muestras que no contenían espermatozoides. La desventaja del Nanotrap Sg es que tras más de tres procesos de congelación y descongelación de la muestra, la sensibilidad caía varios niveles(34).

4.3. BASADOS EN LA BIOLOGÍA MOLECULAR.

4.3.1. Basados en ARN.

4.3.1.1. Basados en ARNm.

Los ARNm (ARN mensajero) son moléculas de ADN que desempeñan un papel fundamental en la síntesis de proteínas. A partir de una secuencia de ADN específica se obtiene una molécula de ARNm complementaria mediante un proceso llamado transcripción, de manera que se obtiene una secuencia de nucleótidos formada por los codones. Los codones son secuencias de tres nucleótidos

correspondientes a aminoácidos específicos que son reconocidos por los ARNt (ARN de transferencia). A medida que el ribosoma se desplaza a lo largo del ARNm, va reconociendo las secuencias de nucleótidos y ensamblando cadenas de aminoácidos para así sintetizar una proteína específica, siendo este proceso denominado traducción. Dependiendo de su función, las células transcriben los diferentes genes en diferentes cantidades, lo que permitirá diferenciar los tejidos y fluidos.

Hasta hace poco se pensaba que el ARN se degradaba con rapidez, pero recientemente se ha descubierto que es lo suficientemente estable y resistente como para poder ser empleado en la detección de fluidos biológicos en el análisis forense. En el estudio citado, se realizaron distintas pruebas que demuestran que el ARNm del semen se mantenía estable tras 180 días en todas las condiciones de temperatura, ambiente y luz. Su conservación era mejor cuando las muestras eran húmedas que en las secas, de hecho, se demostró que era recuperable durante al menos 547 días cuando se guardaban muestras húmedas en bolsas de plástico y se conservaban a temperatura ambiente. También se descubrió que era detectable hasta pasado el transcurso de 7 días en las muestras que se encontraban en un espacio exterior sin lluvia(35).

Se puede analizar el ARNm mediante la técnica RT-PCR combinando la utilización de la transcriptasa inversa para convertir ARN en ADN complementario con la posterior amplificación de los ácidos nucleicos mediante una PCR o reacción en cadena de la polimerasa. La PCR permite amplificar el material genético para analizar el ADN de la muestra, en este caso el obtenido a través de la transcripción inversa del ARNm. Para ello es necesario el ADN molde, nucleótidos, cebadores (llamados habitualmente “*primers*”), una ADN polimerasa y un pH y temperatura adecuados que se consiguen gracias al tampón y al termociclador. La primera fase consiste en la desnaturalización del ADN exponiéndolo a altas temperaturas de entre 90-95°C. A continuación, sucede la fase de hibridación, en la que se baja la temperatura hasta los 40-60°C para conseguir la unión de los cebadores. Por último, se realiza el proceso de

extensión, en el que la ADN polimerasa incorpora nucleótidos a la cadena molde de ADN desnaturalizada previamente en el extremo 3'.

Las ventajas de este método sobre los análisis bioquímicos tradicionales son las siguientes: la posibilidad de coextraer ADN y ARN de la misma muestra, una mayor especificidad, mayor rapidez a la hora de realizar la prueba, menor consumo de recursos. Además, existe la posibilidad de realizar un análisis semiautomático y simultáneo de distintas pruebas ya que usan un formato inicial común, permitiendo que estos tests sean menos operador-dependientes. Otra capacidad de la RT-PCR es la detección de ARNm en muestras tanto de semen (con presencia de espermatozoides) como de fluido preseminal (con ausencia de espermatozoides)(36).

Entre los marcadores utilizados en esta técnica se encuentran los siguientes. Para los espermatozoides se pueden utilizar protaminas (proteínas implicadas en la condensación de la cromatina durante la formación de los espermatozoides), concretamente la protamina 2, ya que aporta mejores resultados en la transcripción del ARNm que la protamina 1. Independientemente de esto, ambas han demostrado una alta especificidad en la detección de espermatozoides y manchas de semen, dado que son marcadores que no se encuentran en manchas de sangre (tanto circulatoria como menstrual), saliva o tejido endometrial. Para el fluido preseminal se usan las transglutaminas (TGMs), que son proteínas que se encuentran por los distintos tejidos del organismo. En concreto, la transglutaminasa 4 (TGM4) es específica de la próstata y por ello es la elegida para el análisis del fluido preseminal (37).

La principal limitación de este método es la mayor inestabilidad de las proteínas del ARN en comparación con el ADN, debido a la ubicuidad de las ARNasas. Pero gracias a los avances en estudios descritos anteriormente, se ha descubierto que llevando a cabo técnicas en las que se aísla a la vez ADN y ARN procedente de la misma muestra, se pueden evitar estas limitaciones. Esto permite que a pesar de obtener manchas heterogéneas de distintos

fluidos, al analizarlos se pueda distinguir cuál es su procedencia(38).

La RT-PCR también sirve para la detección de otros fluidos biológicos tales como la saliva o la sangre. Esta última tiene una gran importancia en la ciencia forense, sobre todo en los casos de violencia sexual, ya que permite diferenciar la sangre procedente del aparato circulatorio, que podría aparecer en el escenario del crimen tras un traumatismo, de la sangre de origen menstrual(39).

4.3.1.2. Basados en ARNm.

Los microARN son ARNs monocatenarios, pequeños, no codificantes, de entre 19 y 25 nucleótidos, que se unen al ARNm para inhibirlo e impedir la síntesis de proteínas. Los genes que codifican a los ARNm se pueden encontrar en exones e intrones, de manera que aparecen patrones específicos para cada tejido(40).

Para el estudio de los fluidos corporales en genética forense se realiza una secuenciación de ARNm a partir de perfiles de STR de la muestra. Para ello se transcribe el ARN a ADNc (ADN complementario), que posteriormente se purifica mediante electroforesis. El método elegido para llevar a cabo la detección es el mismo que el del ARNm, una RT-PCR. Mediante este análisis se diferencian con facilidad los niveles de expresión en sangre, saliva y semen; ya que los ARNm son específicos de cada tejido y a la vez son diferentes entre individuos(41).

Las ventajas del ARNm es que está protegido frente a las ARNasas y que tienen altos niveles de expresión. Muestran una gran estabilidad ante condiciones ambientales adversas (como cambios de temperatura o radiación UV). Sin embargo, su análisis aún es una técnica emergente, y es necesario elaborar una técnica estándar que aporte reproducibilidad y fiabilidad para poder aplicarlo en la práctica forense(42).

Existen diferentes tipos de marcadores para cada tipo de fluido corporal permitiendo que se puedan distinguir entre ellos. Concretamente del semen hay una gran cantidad de ARNm

específicos, destacando los siguientes: miR-888, miR-10b y miR135a(43).

4.4. BASADOS EN LA METILACIÓN DEL ADN.

El proceso de metilación del ADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo (CH_3), cedido por la S-adenosil metionina (SAM), al carbono 5 de la citosina, siendo esta reacción catalizada por las ADN-metiltransferasas (DNMTs). Esta unión sucede en las zonas del ADN donde se encuentran los dinucleótidos de citosina y guanina (CpG), que se agrupan formando las "islas CpG". Dentro de las funciones de la metilación del ADN destacan las siguientes: capacidad de inhibir la expresión de genes, inactivación del cromosoma X, protección del genoma de la transcripción y tiene cierta actividad en la huella genómica o "imprinting". Así mismo, errores en la metilación del ADN están implicados en el desarrollo de diferentes enfermedades tales como cáncer, diabetes, desordenes psicológicos y enfermedades autoinmunes(44).

Para el análisis de estos patrones de metilación del ADN es necesario llevar a cabo un tratamiento del ADN mediante bisulfito, que permite diferenciar posteriormente mediante secuenciación o minisequenciación aquellas citosinas metiladas de las no metiladas. Posteriormente se calcula el nivel de metilación de los diferentes loci analizados, lo que nos permitirá inferir el tejido de origen más probable de la muestra, ya que es un método que permite identificar diferentes fluidos al mismo tiempo (45).

Las ventajas de este método son las siguientes: posibilidad de crear un procedimiento estandarizado, sencillo y potencialmente automatizable (debido a que no es observador dependiente), en el que se evita el consumo de pruebas potenciales, ya que sólo es necesaria una pequeña porción de ADN. Todas estas características, junto con la alta sensibilidad y especificidad para la detección de semen, permiten conseguir una reducción de los costes. Además, destaca la mayor estabilidad del ADN en comparación con las proteínas utilizadas en

otros métodos. También cabe destacar la posibilidad de analizar varios fluidos diferentes a la vez en la misma prueba.

La principal desventaja es que es un método que se basa en la cuantificación de la metilación en diferentes marcadores, lo cual supondría un problema en muestras contaminadas o mezclas de diferentes fluidos; mientras que otras técnicas, como por ejemplo el análisis al microscopio sí que permiten la detección de semen independientemente de que sea un componente minoritario dentro de la mezcla (46). Debido a esto, en caso de obtener resultados no concluyentes, se podría utilizar el análisis visual para confirmar la existencia de semen. También hay que tener en cuenta que se pueden producir falsos positivos en los casos en los que el individuo sea azoospermico (47). Además, la conversión con bisulfito es una técnica muy agresiva que fragmenta el ADN y reduce su complejidad, por lo que las cantidades de ADN inicial requeridas son mayores que para los análisis de ADN destinados a la obtención de un perfil identificativo.

Para la identificación de los fluidos corporales se emplean los tDMR (*tissue-specific Differentially Methylated Region*), que son regiones del ADN que muestran diferentes patrones de metilación, siendo específicos de cada tipo de tejido y permitiendo la diferenciación entre ellos. Dentro de los marcadores que actualmente están siendo estudiados para la identificación de semen destacan FGF7, DACT1, USP49 y ZC3H12D por su elevada especificidad, sin embargo, aún se necesitan más estudios para su correcta aplicación en la genética forense (48). Una de las técnicas novedosas que se podría emplear es la MPS, que es capaz de combinar la detección de marcadores de diferentes tejidos (49), y además resulta útil a la hora de estimar el tiempo que lleva la mancha en una determinada superficie y para determinar la edad del donante (50).

Otras utilidades de la metilación del ADN adicionales a la identificación de fluidos corporales son las siguientes: determinación de la edad del donante de la muestra, detección de ADN artificial y distinción de gemelos monocigóticos(51).

4.5. MICROBIOMAS.

Es una técnica emergente de la que aún no existen demasiados estudios. La definición de microbioma es la comunidad de microorganismos con sus elementos genéticos que ocupan un hábitat específico. Para su estudio se utiliza técnicas como la MPS que permite el análisis simultáneo de las secuencias, siendo posible combinar un gran número de muestras y marcadores, y se estudia la presencia de los diferentes organismos en la muestra utilizando loci que permiten diferenciar especies (52). Las posibles aplicaciones de los microbiomas en genética forense son las siguientes: determinar la procedencia geográfica, ancestralidad y estilo de vida del individuo del que procede la muestra, determinar el fluido biológico presente en el vestigio, determinar la causa y fecha de muerte, investigar crímenes de bioterrorismo o buscar indicadores de agresión sexual(53).

Las bacterias que aparecen predominantemente en el semen son: *Prevotella*, *Lactobacillus* y *Pseudomonas* (54). Actualmente, falta aún mucha investigación respecto a las muestras de semen. Para poder implementar su aplicación generalizada al mundo de la genética forense se deben establecer protocolos estándar sobre la recolección y mantenimiento de las muestras, que posteriormente tendrán que ser validados. También es necesaria la creación de una base de datos fiable y completa para poder interpretar los resultados correctamente(55).

Los estudios más avanzados actualmente se basan en el análisis del microbioma de la piel, la saliva o los fluidos vaginales para la identificación de individuos(56).

5. ANÁLISIS NUEVAS TENDENCIAS.

Dentro de este apartado el objetivo es describir y clasificar las tendencias de los nuevos ensayos que han sido desarrollados durante los últimos 5 años para la detección de fluido seminal y que permiten mejorar la sensibilidad y especificidad de los métodos habituales.

En primer lugar, los 36 estudios se han clasificado en función de la metodología utilizada descrita previamente en el apartado 4, dando lugar a los siguientes resultados (Figura 8):

- Inmuncromatográficos: 2
- Espectrometría de masas: 2
- Metilación de ADN: 8
- ARNmi: 8
- Microbiomas: 3
- mRNA: 13

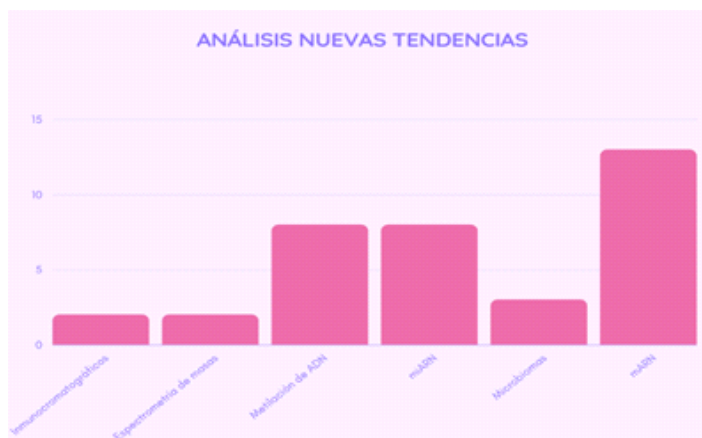


Figura 8. Clasificación en función de la metodología utilizada de los nuevos ensayos de detección de fluido seminal desarrollados en los últimos 5 años.

De los métodos **inmuncromatográficos** sólo se han encontrado dos estudios, uno basado en reacciones antígeno-anticuerpo y otro en métodos de fluorescencia, pero ambos utilizan la semenogelina como biomarcador del fluido seminal.

En relación con la **espectrometría de masas**, ambos estudios emplean como biomarcador seminal la semenogelina-2 y que basan su acción en la digestión de la tripsina.

En la actualidad los métodos más ampliamente investigados son los basados en biología molecular, incluyendo la metilación de ADN, el estudio de los microbiomas y la detección de ARNmi, y destacando el estudio de los **ARNm**. Se han identificado una serie de biomarcadores de ARNm que son específicos del fluido seminal, siendo los más utilizados: PRM1, PRM2 Y SEMG-1.

En cuanto a los **ARNmi**, destaca la gran cantidad de diferentes marcadores identificados para la detección de fluido seminal, siendo el de uso más generalizado el miR-888-5p, y empleando generalmente la técnica de RT-qPCR.

Para los ensayos basados en **metilación del ADN**, todos los estudios incluyen marcadores específicos de la saliva en adición al semen. Los marcadores de fluido seminal mayormente empleados son SE3 y SE4. Las pruebas que están siendo más utilizadas son el ensayo de metilación multiplex mediante minisequenciación o *SNaPshot* y la *ARMS-PCR* (*amplification refractory mutation system-PCR*), previa conversión del ADN con bisulfito.

De entre los métodos basados en biología molecular, el que cuenta con menos estudios publicados recientemente es el análisis de los **microbiomas**, esto se debe a que abundan los

estudios referentes a otros fluidos de importancia biológica, sin embargo, su capacidad de analizar la presencia de semen aún está siendo investigada. Las bacterias más frecuentemente detectadas en el fluido seminal son los *Staphylococcus* y los *Corynebacterium*, empleando para ello la amplificación de 16S ADN (ADN recombinante).

La tendencia generalizada entre las metodologías basadas en biología molecular es que los ensayos permitan la diferenciación simultánea de otros fluidos de importancia biológica, destacando: fluido vaginal, sangre venosa, sangre menstrual y saliva.

Otros fluidos menos utilizados son: heces, piel, orina y secreciones nasales. Es sumamente importante este gran avance, ya que al poder analizar diferentes fluidos al mismo tiempo se consigue reducir la cantidad de muestra necesaria, y con ello, disminuir el tiempo de realización de la prueba y también los costes.

6. CONCLUSIONES.

La detección de fluido seminal es de extrema importancia en la genética forense, destacando su papel en los casos de investigaciones relacionadas a delitos sexuales, ya que confirmar la naturaleza del fluido puede ser un elemento crucial en la reconstrucción de los hechos.

Las técnicas de microscopía óptica y las luces forenses UV han sido y siguen siendo ampliamente utilizadas, pero son altamente dependientes de la habilidad y experiencia del investigador. Las técnicas inmunocromatográficas para la detección de fluido seminal, tales como la detección de la PSA o de la semenogelina, son altamente sensibles y por ello son las más ampliamente utilizadas en los laboratorios de genética forense.

Los métodos de identificación de fluido seminal que están siendo más ampliamente estudiados en la actualidad son los basados en biología molecular, especialmente la detección de mRNA, en ensayos de tipo multiplex que

incluyen varios *targets* para la detección de fluido seminal y otros fluidos de interés en genética forense.

Los métodos basados en biología molecular permiten la identificación simultánea de varios fluidos corporales en un mismo ensayo, reduciendo la cantidad de muestra utilizada, lo que evita tener que priorizar unos análisis frente a otros en casos en los que el vestigio biológico es limitante. Sin embargo, para su aplicación en la rutina forense se requiere un mayor desarrollo, estandarización y validación.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. CARRACEDO A, SALAS A, LAREU MV. Problemas y retos de futuro de la genética forense en el siglo XXI. Cuadernos de Medicina Forense. junio de 2010;16(1-2):31-5.
2. GOODWIN, WILLIAM, LINACRE, ADRIAN, HADI, SIBTE. An introduction to Forensic Genetics. 2.a ed. Hoboken-New Jersey: Wiley-Blackwell; 2010.
3. LÓPEZ CB. DOSSIER I: El ADN: una certeza científica que nos hace únicos (parte I). Cuadernos de criminología: revista de criminología y ciencias forenses. 2014;(27):11-5.
4. CARRACEDO Á. La variabilidad genética de los micro y minisatélites y su aplicación en medicina legal [Internet]. Universidade da Coruña; 1996 [citado 3 de abril de 2023]. Disponible en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/9461>
5. DECORTE R. Genetic identification in the 21st century-- Current status and future developments. Forensic Sci Int. 10 de septiembre de 2010;201(1-3):160-4.
6. SIJEN T, HARBISON S. On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. Genes (Basel). 28 de octubre de 2021;12(11):1728.
7. AN JH, SHIN KJ, YANG WI, LEE HY. Body fluid identification in forensics. BMB Rep. octubre de 2012;45(10):545-53.
8. VIRKLER K, LEDNEV IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic Sci Int. 1 de julio de 2009;188(1-3):1-17.
9. SAKURADA K, WATANABE K, AKUTSU T. Current Methods for Body Fluid Identification Related to Sexual Crime: Focusing on Saliva, Semen, and Vaginal Fluid. Diagnostics (Basel). 14 de septiembre de 2020;10(9):693.

10. LÓPEZ GARCÍA MJ, URBANO FELICES A, CÁRDENAS POVEDANO M. Manual de laboratorio para el análisis del semen [Internet]. 1st ed. OmniaScience; 2012 [citado 15 de enero de 2023]. Disponible en : <https://www.omniascience.com/books/index.php/scholar/catalog/book/16>
11. DU PLESSIS SS, GOKUL S, AGARWAL A. Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)*. 1 de enero de 2013;5(1):224-31.
12. RODRIGUEZ-MARTINEZ H, MARTINEZ EA, CALVETE JJ, PEÑA VEGA FJ, ROCA J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? *Int J Mol Sci*. 22 de abril de 2021;22(9):4368.
13. VANDENBERG N, VAN OORSCHOT RAH. The use of Polilight in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests. *J Forensic Sci*. marzo de 2006;51(2):361-70.
14. FINNIS J, DAVIDSON G, FRASER I, MURPHY C, HARGREAVES C, STEVENSON N, et al. Illuminating the benefits and limitations of forensic light sources. *Sci Justice*. enero de 2023;63(1):127-34.
15. NELSON DG, SANTUCCI KA. An alternate light source to detect semen. *Acad Emerg Med*. octubre de 2002;9(10):1045-8.
16. CHUEN LW, EE KB. Forensic Light Sources for Detection of Biological Evidences in Crime Scene Investigation: A Review. 2010;1.
17. BASSET P, BLANDIN P, GRINI A, DELEMONT S, SAMIE L, CASTELLA V. A simplified protocol for the detection of blood, saliva, and semen from a single biological trace using immunochromatographic tests. *Forensic Sci Med Pathol*. 1 de junio de 2022;18(2):141-8.
18. WESTRING CG, WIUF M, NIELSEN SJ, FOGLEMAN JC, OLD JB, LENZ C, et al. SPERM HY-LITERTM for the identification of spermatozoa from sexual assault evidence. *Forensic Sci Int Genet*. septiembre de 2014;12:161-7.
19. GEORGE N, SINGH H, JOTANIYA R, PANDYA SR. Raman spectroscopy for the determination of forensically important bio-fluids. *Forensic Sci Int*. noviembre de 2022;340:111441.
20. ZAPATA F, FERNÁNDEZ DE LA OSSA MÁ, GARCÍA-RUIZ C. Emerging spectrometric techniques for the forensic analysis of body fluids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 de enero de 2015;64:53-63.
21. VIRKLER K, LEDNEV IK. Raman spectroscopic signature of semen and its potential application to forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int*. 15 de diciembre de 2009;193(1-3):56-62.
22. SIKIRZHYTSKI V, SIKIRZHYTSKAYA A, LEDNEV IK. Advanced statistical analysis of Raman spectroscopic data for the identification of body fluid traces: Semen and blood mixtures. *Forensic Science International*. 10 de octubre de 2012;222(1):259-65.
23. ORPHANOU CM, WALTON-WILLIAMS L, MOUNTAIN H, CASSELLA J. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Sci Int*. julio de 2015;252:e10-16.
24. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry.
25. PEONIM V, WORASUWANNARAK W, SUJIRACHATO K, TEERAKAMCHAI S, SRISONT S, UDNOON J, et al. Comparison between prostate specific antigen and acid phosphatase for detection of semen in vaginal swabs from raped women. *J Forensic Leg Med*. agosto de 2013;20(6):578-81.
26. POSADA Y. Semenogelina y Antígeno Específico de Próstata en Semen. 2011.
27. HEALY DA, HAYES CJ, LEONARD P, MCKENNA L, O'KENNEDY R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *Trends in Biotechnology*. 1 de marzo de 2007;25(3):125-31.
28. MANNELLO F, CONDEMI L, CARDINALIA, BIANCHI G, GAZZANELLI G. High Concentrations of Prostate-Specific Antigen in Urine of Women Receiving Oral Contraceptives. *Clinical Chemistry*. 1 de enero de 1998;44(1):181-3.
29. YU H, DIAMANDIS EP, MONNE M, CROCE CM. Oral Contraceptive-induced Expression of Prostate-specific Antigen in the Female Breast (). *Journal of Biological Chemistry*. 24 de marzo de 1995;270(12):6615-8.
30. KELLY MC. Pre-ejaculate fluid in the context of sexual assault: A review of the literature from a clinical forensic medicine perspective. *Forensic Sci Int*. enero de 2021;318:110596.
31. SATO I, YOSHIIKE M, YAMASAKI T, YOSHIDA K, TAKANO S, MUKAI T, et al. A dot-blot-immunoassay for semen identification using a polyclonal antibody against semenogelin, a powerful seminal marker. *Forensic Sci Int*. 15 de octubre de 2001;122(1):27-34.
32. OLD J, SCHWEERS BA, BOONLAYANGOOR PW, FISCHER B, MILLER KWP, REICH K. Developmental validation of RSIDTM-Semen: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of human semen. *J Forensic Sci*. marzo de 2012;57(2):489-99.
33. PANG BCM, CHEUNG BKK. Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Science International*. 14 de junio de 2007;169(1):27-31.
34. SATO I, BARNI F, YOSHIIKE M, RAPONE C, BERTI A, NAKAKI S, et al. Applicability of Nanotrap Sg as a semen detection kit before male-specific DNA profiling in sexual assaults. *Int J Legal Med*. julio de 2007;121(4):315-9.

35. Setzer M, Juusola J, Ballantyne J. Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *J Forensic Sci.* marzo de 2008;53(2):296-305.
36. Juusola J, Ballantyne J. Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci Int.* 12 de agosto de 2003;135(2):85-96.
37. FLEMING RI, HARBISON S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Science International: Genetics.* 1 de julio de 2010;4(4):244-56.
38. ALVAREZ M, JUUSOLA J, BALLANTYNE J. AN MRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem.* 15 de diciembre de 2004;335(2):289-98.
39. HAAS C, KLESSER B, MAAKE C, BÄR W, KRATZER A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci Int Genet.* marzo de 2009;3(2):80-8.
40. SIJEN T. Molecular approaches for forensic cell type identification: On mRNA, miRNA, DNA methylation and microbial markers. *Forensic Sci Int Genet.* septiembre de 2015;18:21-32.
41. PETERSEN CH, HJORT BB, TVEDEBRINK T, KIELPINSKI LJ, VINHER J, MORLING N. Body fluid identification of blood, saliva and semen using second generation sequencing of micro-RNA. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series.* 1 de enero de 2013;4(1):e204-5.
42. SILVA SS, LOPES C, TEIXEIRA AL, CARNEIRO DE SOUSA MJ, MEDEIROS R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? *Forensic Sci Int Genet.* enero de 2015;14:1-10.
43. GLYNN CL. Potential applications of microRNA profiling to forensic investigations. *RNA.* enero de 2020;26(1):1-9.
44. KADER F, GHAI M, OLANIRAN AO. Characterization of DNA methylation-based markers for human body fluid identification in forensics: a critical review. *Int J Legal Med.* enero de 2020;134(1):1-20.
45. FRUMKIN D, WASSERSTROM A, BUDOWLE B, DAVIDSON A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet.* noviembre de 2011;5(5):517-24.
46. WASSERSTROM A, FRUMKIN D, DAVIDSON A, SHPITZEN M, HERMAN Y, GAFNY R. Demonstration of DSI-semen--A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci Int Genet.* enero de 2013;7(1):136-42.
47. LARUE BL, KING JL, BUDOWLE B. A validation study of the Nucleix DSI-Semen kit--a methylation-based assay for semen identification. *Int J Legal Med.* marzo de 2013;127(2):299-308.
48. KADER F, GHAI M. DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Sci Int.* abril de 2015;249:255-65.
49. RICHARDS R, PATEL J, STEVENSON K, HARBISON S. Evaluation of massively parallel sequencing for forensic DNA methylation profiling. *Electrophoresis.* noviembre de 2018;39(21):2798-805.
50. HAAS C, NEUBAUER J, SALZMANN AP, HANSON E, BALLANTYNE J. Forensic transcriptome analysis using massively parallel sequencing. *Forensic Sci Int Genet.* mayo de 2021;52:102486.
51. GRŠKOVIĆ B, ZRNEC D, VICKOVIĆ S, POPOVIĆ M, MRŠIĆ G. DNA methylation: the future of crime scene investigation? *Mol Biol Rep.* julio de 2013;40(7):4349-60.
52. YANG Y, XIE B, YAN J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* octubre de 2014;12(5):190-7.
53. SCHMEDES SE, SAJANTILA A, BUDOWLE B. Expansion of Microbial Forensics. *J Clin Microbiol.* agosto de 2016;54(8):1964-74.
54. WENG SL, CHIU CM, LIN FM, HUANG WC, LIANG C, YANG T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One.* 2014;9(10):e110152.
55. OLIVEIRA M, AMORIM A. Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* diciembre de 2018;102(24):10377-91.
56. CHO HW, EOM YB. Forensic Analysis of Human Microbiome in Skin and Body Fluids Based on Geographic Location. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:695191.