

Evaluación de la persistencia de espermatozoides humanos en la vagina

Evaluation of persistence of human spermatozoa in the vagina

Mercedes Salcedo-Cifuentes PhD¹

Introducción: la determinación del tiempo de persistencia de los espermatozoides en el frotis vaginal poscoital tiene especial importancia en la investigación de los delitos sexuales. **Objetivo:** evaluar la persistencia de espermatozoides en muestras de frotis vaginales poscoitales a diferentes tiempos durante cinco días en mujeres voluntarias. **Materiales y métodos:** se realizó un estudio experimental, descriptivo en muestras de frotis vaginal poscoital tomadas cada ocho horas durante 128 horas. Las muestras se sometieron a un proceso de extracción, sedimentación y coloración supravital. Se realizó el análisis estadístico utilizando el software Minitab 16. A las variables cuantitativas se les calculó las medidas de tendencia central y de dispersión y a las cualitativas las proporciones. Además, se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras recolectadas en el mismo intervalo de tiempo aplicando un test de ANOVA unidireccional para un nivel de significancia del 0,05. **Resultados:** de 18 muestras de mujeres voluntarias en el 60% se observaron, en las primeras 72 horas, más de 10 espermatozoides por campo, 10% de estas muestras llegaron a las 128 horas con más de cinco espermatozoides y 2% con uno por campo. Se observó una disminución marcada del número de espermatozoides en dos muestras con abundante reacción leucocitaria y alta densidad de levaduras, hifas, pseudohifas y bacterias. **Conclusiones:** los espermatozoides persisten en la vagina por más de 72 horas, lo que representa un hecho importante a considerar en los protocolos de investigación en criminalística y ciencias forenses para la determinación de delitos sexuales.

Palabras clave: recuento de espermatozoides, frotis vaginal, coito, violencia sexual

Introduction: Determination of persistence of spermatozoa in postcoital vaginal smears is especially important in sexual assault investigation. **Objective:** To evaluate the persistence of spermatozoa in postcoital vaginal smears samples at different times during 128 hours in female volunteers.

¹Bacterióloga y Laboratorista Clínico, especialista en Calidad, MSc en Epidemiología, PhD en Ciencias Biomédicas. Profesora asociada, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Grupo de Investigación CALIMET. Cali, Colombia. Correspondencia: Calle 4B N.º 36 - 00. Edificio 134, piso 2. Teléfono: 57 2 5581929. Correo electrónico: mercysal2003@yahoo.com.

Conflicto de intereses: la autora declara que no tiene conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2015; 21: 149-160

Módulo 19 (Investigación), número 31. Editora Médica Colombiana S.A. 2015®

Recibido el 12 de marzo de 2015; aceptado el 12 de abril de 2015

Materials and methods: Experimental, descriptive study was made in postcoital vaginal smears samples collected every eight hours during five days. The samples were subjected to an extraction process, sedimentation and supra-vital staining. Statistical analysis was performed using Minitab 16 software. Measures of central tendency and dispersion were calculated for quantitative variables; and proportions for qualitative variables. In addition, we assessed whether there were statistically significant differences between the samples collected at the same time interval through an ANOVA (unidirectional) test, to a significance level of 0.05. **Results:** From 18 samples of female volunteers in 60% were obtained within the first 72 hours over 10 spermatozoon per field; 10% of those samples reached 128 hours with over five sperm; and 2% with 1 spermatozoon per field. In two samples with abundant leukocyte reaction and with high density of yeasts, hyphae, pseudohyphae and bacteria, a marked decrease in sperm count was observed. **Conclusions:** spermatozoa persist at vagina beyond 72 hours, a finding that is of utmost importance to consider in research protocols in criminology and forensic sciences during sexual assault investigation.

Keywords: Sperm count, vaginal smears, coitus, sexual violence

Salcedo-Cifuentes M. Evaluación de la persistencia de espermatozoides humanos en la vagina. *Medicina & Laboratorio* 2015; 21: 149-160.

La persistencia de espermatozoides en la cavidad vaginal es una prueba que, en conjunto con el examen médico, desempeña un rol importante en la corroboración de los delitos de índole sexual. Sin embargo, la detección microscópica de éstos varía de acuerdo al tiempo transcurrido entre el asalto sexual y la recolección de la evidencia a partir de la supuesta víctima para el procesamiento y evaluación [1,2].

Diferentes estudios que han valorado la permanencia de espermatozoides en la vagina después del coito han mostrado tiempos muy variables para su determinación. Pollack (1943) en su trabajo [3] y Dziak y colaboradores (2011) [4] en su revisión sistémica encontraron tiempos que variaban entre los 30 minutos hasta los 17 días. Otros trabajos han encontrado espermatozoides completos inmóviles en muestras de interés forense entre las primeras 12 a 16 horas después del asalto sexual [5,6], excepcionalmente entre las 18 y 24 horas [1,7-9] e incluso entre las 72 y 96 horas [1,10-12]. Morrison (1972) [13] reportó la presencia de espermatozoides en frotis vaginales después de nueve días del asalto sexual. En general, se ha descrito que a medida que aumenta el intervalo de tiempo poscoital la proporción de muestras positivas para espermatozoides disminuye [4]. En el límite superior de los tiempos promedios reportados la mayoría de las muestras son negativas [5,11,14].

La detección de espermatozoides en muestras involucradas en presuntos asaltos sexuales es un marcador biológico contundente para definir una eyaculación reciente (de menos de 72 horas). Para la detección de semen, independiente de si se observan o no los espermatozoides, se han utilizado diferentes métodos como la fluorescencia y la detección de la fosfatasa ácida directamente en la mancha de semen encontrada; sin embargo, representan únicamente pruebas de orientación cuyos resultados no son confirmatorios de la presencia de semen [14,15]. Otra técnica utilizada es la determinación de la proteína p30, conocida en el campo clínico como antígeno específico prostático, que se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo, pero cuya estabilidad en función del tiempo es baja [6,9]. Esta proteína se ha detectado entre las 16 y 72

horas posasalto sexual [4], lo cual limita su aplicación en el estudio de los casos de violencia sexual en los cuales la mayoría de las veces las víctimas acuden después de las 72 horas del asalto sexual. Finalmente, y quizás la más usada, es la técnica microscópica basada en un coloración de contraste orientada a la búsqueda y recuento de los espermatozoides [2].

La celeridad en la toma de muestras y la valoración de los factores que afectan la persistencia de los espermatozoides en la vagina es de gran importancia, dado que hasta el momento es la única técnica de certeza con la que se cuenta en la investigación forense de la violencia sexual y cuyo resultado positivo permite los estudios posteriores de identificación del presunto agresor a través del análisis de genética forense. Actualmente, la mayoría de las sentencias se están dictando con base en el aporte dado por la medicina forense a través de sus informes técnicos médico legales. Sin embargo, estos procedimientos tienen una alta incertidumbre entre expertos, sin contar que los desgarros o laceraciones sanan rápidamente haciéndolos imperceptibles para el evaluador [16-18]. En la práctica, durante la atención a una víctima de delito sexual, los médicos legistas o los médicos de los servicios de salud recolectan las muestras vaginales sólo cuando la víctima es atendida durante las primeras 72 horas siguientes al asalto sexual [19,20].

Dada la gran variabilidad encontrada en la literatura respecto al tiempo máximo hasta el que persisten los espermatozoides en la vagina después del coito y a la ausencia de estudios que documenten el efecto de diferentes variables en la presencia de éstos en la vagina se propuso la realización de este estudio, cuyo objetivo fue establecer el tiempo máximo de persistencia de los espermatozoides en muestras de frotis vaginal poscoital recolectados por mujeres voluntarias periódicamente durante 128 horas después de un único coito.

Materiales y métodos

Tipo de estudio y tamaño muestral

Se realizó un estudio experimental y descriptivo en mujeres voluntarias con pareja sexual estable, madres o estudiantes de último año de los programas de Medicina, Enfermería y Bacteriología de la Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Para el cálculo del tamaño de la muestra se utilizó como referente la fórmula propuesta por Cicchetti (1981) [21]:

$$n=2(K)^2$$

Donde K corresponde al número de categorías de la variable de interés, para este caso presencia o ausencia de espermatozoides (K=2). Al aplicar la fórmula se obtuvo:

$$N= 2(2)^2 = 16$$

Considerando un porcentaje de pérdida del 10% la muestra efectiva final fue de 18 mujeres.

Obtención de muestras

Las mujeres voluntarias recibieron un curso de inducción en el cual se les explicó el propósito del estudio y los requisitos a cumplir los cuales se resumen en: a) Mantener una abstinencia

sexual de cinco días previo al inicio del estudio; b) Tener un único coito sin uso de condón cinco días después de su último ciclo menstrual; c) Informar la última fecha de su ciclo menstrual; d) Cumplir con la abstinencia sexual durante el tiempo de recolección de las muestras; e) Recolectar todas las muestras de frotis vaginal; f) Reportar si presentaban algún tipo de cambio en el flujo vaginal.

Para el proceso de recolección de la muestra: a) Se entregó un estuche de toma de muestras que contenía 16 sobres de manila cada uno de ellos en una bolsa plástica resellable. En el interior de cada sobre se encontraban dos sobres más cada uno con un aplicador. Todos los sobres estaban identificados con el número consecutivo de radicación del caso para el estudio, además tenían un rótulo que debía ser diligenciado por la voluntaria con los datos de hora y fecha de recolección de la muestra; b) Para la recolección de la muestra se elaboró un instructivo en el cual se recomendó lo siguiente:

- Tomar la primera muestra dentro de la primera hora después del coito y repetir el procedimiento cada ocho horas después de la obtención de esta muestra durante cinco días, es decir, hasta completar 128 horas post-coito
- Llevar a cabo el procedimiento de pie con una pierna sobre una silla
- Tomar los aplicadores por el extremo libre de torunda de algodón
- Separar los labios mayores con los dedos
- Introducir el aplicador por el canal vaginal hasta tocar el fondo
- Rotar unas cuatro veces el aplicador suavemente en el interior de la vagina para una buena impregnación del fluido vaginal
- Repetir los pasos con el segundo aplicador
- Elaborar un frotis en placa solo con la primera muestra de frotis vaginal poscoital recolectada
- Dejar secar a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos tanto el frotis hecho en placa como los dos aplicadores, sin exponer al calor
- Guardar cada aplicador en su respectivo sobre de manila después del tiempo de secado y éste en la bolsa resellable
- Guardar las placas con los frotis en las cajas de almacenamiento en acrílico entregadas a cada participante
- Almacenar de manera temporal las muestras de frotis recolectadas en los aplicadores en la nevera y las cajas de acrílico con las placas de frotis vaginal a temperatura ambiente hasta ser entregadas un día después de la recolección de cada una de ellas a la investigadora del presente trabajo.
- El resumen gráfico del procedimiento de recolección de la muestra entregado en el instructivo a las mujeres voluntarias se presenta en la [figura 1](#).

Almacenamiento de las muestras

Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Bioquímica Clínica de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad del Valle, Cali, Colombia, para su almace-

miento: los aplicadores con muestra de frotis vaginal a -20°C hasta el día de su procesamiento y las placas con frotis vaginal fueron coloreadas con tinción de Gram y luego almacenadas en cajas de acrílico hasta el día de su procesamiento.

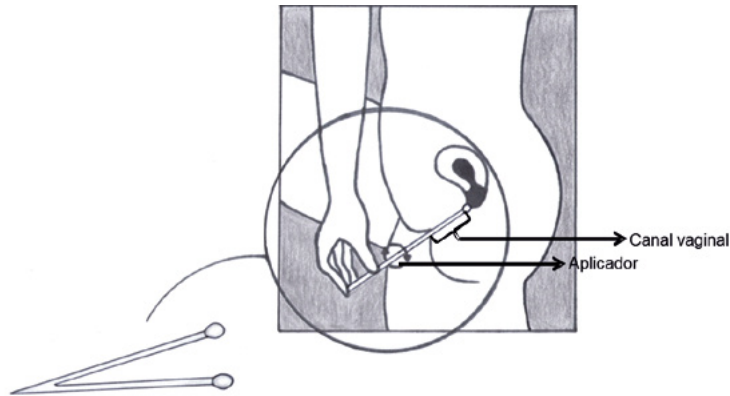


Figura 1. Procedimiento de toma de muestra de frotis vaginal recomendado a las mujeres que aceptaron participar del estudio.

Procesamiento analítico de las muestras

Las muestras de frotis vaginal en placas coloreadas con tinción de Gram fueron valoradas microscópicamente con objetivo de 100X y aceite de inmersión. Los aplicadores con muestras de frotis vaginal fueron procesados para obtener preparaciones permanentes usadas para la búsqueda de espermatozoides a través de estudio microscópico. El procedimiento analítico de estas muestras se apoyó en el protocolo del Departamento de Ciencias Forenses de Virginia, Estados Unidos [22], que consistió brevemente en:

1. Atemperar las muestras a $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ para su procesamiento
2. Realizar a cada aplicador un recorte en forma de media luna como se ilustra en la [figura 2](#)
3. Realizar el mismo procedimiento en un aplicador nuevo (control negativo) por cada aplicador con muestra
4. Colocar cada fragmento de algodón en microtubos para centrifuga de 0,65 mL marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania)
5. Dispensar 1.000 μL de agua destilada a cada tubo con el fragmento de algodón
6. Mezclar la preparación en agitador tipo vórtex por 5 minutos
7. Dejar durante 20 minutos a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)
8. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos
9. Eliminar el sobrenadante



Figura 2. Corte en media luna de los aplicadores a procesar.

10. Mezclar muy bien el remanente
11. Elaborar dos preparaciones de 1 cm x 1 cm sobre placa portaobjetos, una con el control negativo (preparado con agua destilada) y otra con la muestra de estudio
12. Dejar secar a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)
13. Fijar a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 minutos
14. Colorear con Árbol de Navidad, según protocolo del Departamento de Ciencias Forenses de Virginia, Estados Unidos [22].
15. Revisar las preparaciones en microscopio bajo objetivo de 40X con aceite de inmersión. Si hay dudas confirmar las observaciones bajo objetivo de 100X.
16. Contar el número de espermatozoides presentes por campo en 50 campos bajo objetivo de 40X.

Variables de estudio

Como variables de estudio independientes se consideraron la edad de la mujer, los intervalos de tiempo de las muestras poscoitales, la fecha de la última menstruación y las características de la microbiota vaginal presente, así como el recuento de leucocitos. La variable dependiente fue conteo de espermatozoides por campo en 50 campos.

Análisis de los datos

El análisis estadístico y las gráficas se hicieron utilizando el software Minitab 16 (Minitab Inc., Pensilvania, Estados Unidos). A las variables cuantitativas se les calculó las medidas de tendencia central y dispersión, y a las cualitativas las proporciones. Además, se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas entre las muestras recolectadas en el mismo intervalo de tiempo a través de una prueba de ANOVA unidireccional para un nivel de significancia $p \leq 0,05$ y la influencia de la presencia de levaduras, hifas o pseudohifas en el conteo de espermatozoides mediante la prueba exacta de Fisher, considerando un valor significativo de $p \leq 0,05$.

Lineamientos éticos

El proyecto cumplió con la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, y los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002 [23], en los cuales se considera el consentimiento informado y su participación voluntaria. Además, este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Resultados

En este trabajo participaron 18 mujeres voluntarias con un promedio de edad de 39 años, rango entre 24 y 45 años. Todas las participantes después de un único coito sin uso de condón y cinco días después de su último ciclo menstrual, recolectaron dentro de la primera hora poscoito y cada ocho horas hasta las 128 horas una muestra de frotis vaginal por duplicado para un total de 576 hisopados vaginales. Con relación a la fecha de la última menstruación se obtuvo un alto porcentaje de pérdida de la información (83,3 %).

En la coloración de Gram de los frotis vaginales de las voluntarias se observó en el 67% (12/18) un frotis normal, con predominio de bacilos Gram positivos, moderada cantidad de células escamosas con núcleos de gran tamaño y escasos leucocitos, dando una apariencia muy limpia al fondo del frotis. En el 22% (4/18) de los frotis se observaron abundantes células epiteliales, un recuento moderado de leucocitos y disminución de los bacilos Gram positivos, a lo cual se sumó un aumento en el número de células escamosas con disminución en el tamaño de su núcleo, lo cual también es evidencia de un frotis vaginal normal. En el 11% (2/18) de los frotis vaginales se observó una marcada reacción leucocitaria, abundantes levaduras, hifas, seudohifas y bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, indicativos de un frotis vaginal anormal.

El conteo de espermatozoides en las dos muestras del mismo intervalo de tiempo recolectadas por las mujeres voluntarias fue semejante (prueba de ANOVA, $p=0,058$). El tiempo promedio de positividad para un recuento entre cinco y nueve espermatozoides por campo fue de 92,4 horas y el tiempo máximo para un recuento de un espermatozoide por campo o escasos en toda la placa fue de 128 horas (véase figura 3).

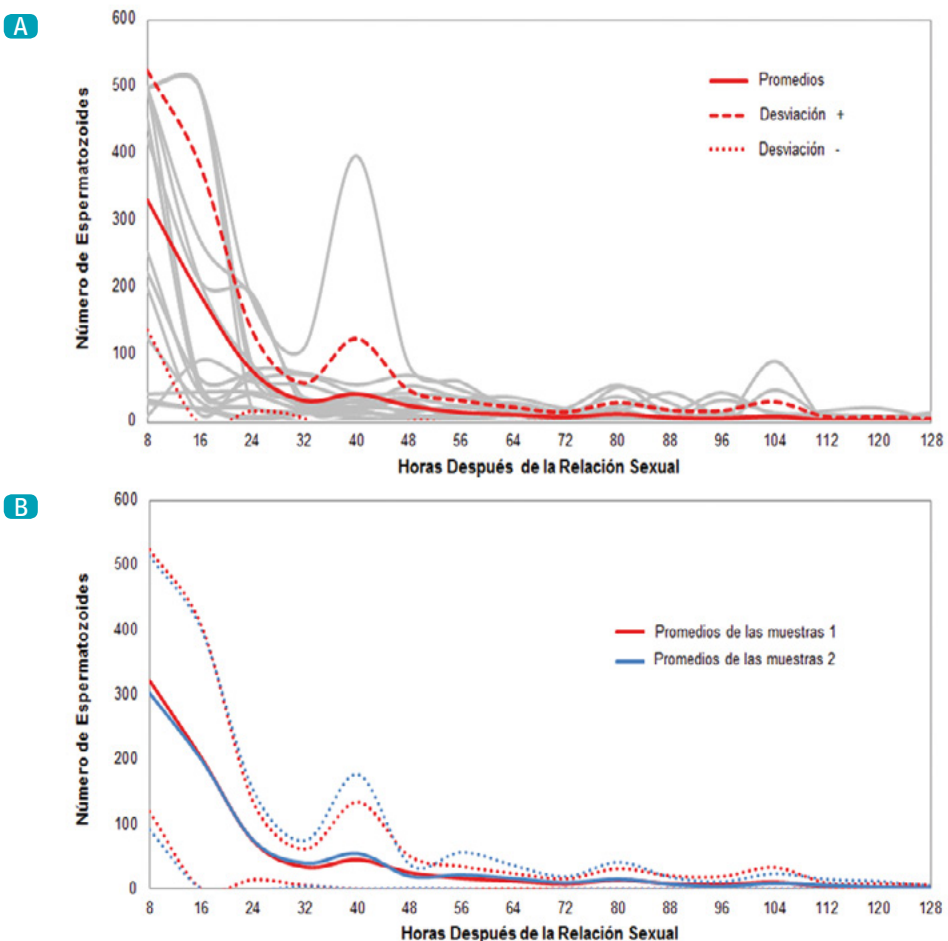


Figura 3. Distribución del número de espermatozoides por preparación según tiempo: A. Sumatoria de los promedios de espermatozoides presentes en las dos muestras recolectadas en los diferentes intervalos de tiempo. B. Promedios de las muestras recolectadas en los diferentes intervalos de tiempo.

La dispersión en el conteo de espermatozoides a partir de las 72 horas se muestra en la figura 4. Una disminución en el número de espermatozoides en toda la preparación fue estadísticamente significativa a partir de las 120 horas poscoito (test de ANOVA, $p=0,0451$). Esta disminución mostró una tendencia no significativa con aquellos frotis en los que a la coloración de Gram presentaron una marcada reacción leucocitaria (test de Fischer, $p=0,709$). Lo mismo se evidenció en dos frotis con marcada alteración en su microbiota vaginal (abundantes levaduras, hifas y seudohifas), a los cuales no se les observó espermatozoides a partir de la segunda muestra poscoital.

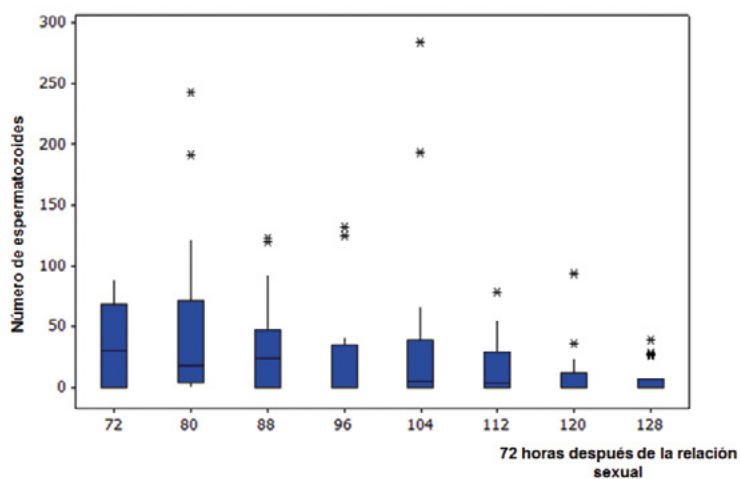


Figura 4. Dispersión del número de espermatozoides por preparación en las muestras tomadas más allá de las 72 horas.

Discusión

En la investigación forense de la violación la detección de semen es necesaria para corroborar el supuesto asalto sexual. El examen médico del denunciante y los análisis de laboratorio practicados sobre muestras biológicas recolectadas durante su valoración médica son pruebas contundentes para la definición de una eyaculación reciente [1,2]. La presencia de semen en la evidencia física o elementos materiales probatorios recolectados en estos casos es un hallazgo que está sujeto a varios factores, donde uno de los más importantes es el tiempo transcurrido [4,24-26]. En este estudio se llevó a cabo un análisis experimental donde se trabajó con muestras de frotis vaginal poscoital recolectados a diferentes tiempos durante 128 horas por un grupo de mujeres voluntarias con pareja sexual estable. Los resultados en términos generales mostraron que los espermatozoides persisten en baja proporción por campo o en toda la preparación hasta las 128 horas poscoito.

La vagina generalmente se considera un medio hostil del cual los espermatozoides deben migrar rápidamente para poder sobrevivir. El pH vaginal normal es de 3,5 a 4,0 mientras que el pH óptimo para la supervivencia espermática es de 7,0 a 8,5 [27]. Por efecto de los estrógenos las células del epitelio vaginal sintetizan y almacenan glucógeno que se descarga a la luz de la vagina a medida que se van descamando. Esta etapa se conoce como fase estrogénica o proliferativa y empieza desde el quinto hasta el 13º día del ciclo menstrual [28]. Durante esta fase la microbiota vaginal normal metaboliza el glucógeno formando ácido láctico que contribuye al bajo pH encontrado en la vagina y con ello a la disminución en el tiempo de persistencia de

los espermatozoides en la vagina [29]. Dado que en más de la mitad de los casos del presente estudio no fue posible establecer la fecha del último período menstrual no se pudo valorar el posible impacto negativo de éste en la persistencia de los espermatozoides en la vagina [29]. Es importante considerar para futuros estudios la medición del pH vaginal en cada una de las muestras recolectadas y registrar la fecha de la última menstruación.

En contraste, en el presente estudio se encontró que tres de las muestras aportadas por las voluntarias, en lugar de encontrarse disminución del recuento de espermatozoides con el tiempo se observó un incremento a las 40 y 104 horas. Estos hallazgos pueden suponer una carga adicional de espermatozoides, es decir, un nuevo coito. Sin embargo, se evidenció que las muestras siguientes a cada uno de estos intervalos se comportaron de manera similar a todas las demás, lo cual sugiere que más que un nuevo coito pudo haber sido algún cambio en el proceso de la toma de la muestra que facilitó llegar más a fondo del saco o incluso más tiempo en el proceso de rotación del aplicador dentro de la vagina, que facilitó que este se impregnara mejor del fluido vaginal.

Previamente se ha encontrado que la etapa del ciclo menstrual afecta la microbiota vaginal. Un estudio realizado por Bartlett (1977) [30] demostró una concentración persistente de anaerobios y una disminución notoria de aerobios, entre ellos lactobacilos o bacilos Döderlein, en muestras tomadas antes de la menstruación, con respecto a muestras posmenstruales. En otro estudio, Larsen y Galask (1982) [27] encontraron un aumento en las especies aerobias y anaerobias durante la menstruación y una disminución en la etapa posmenstrual. Luego, la variabilidad en el tipo de microbiota vaginal da evidencia de un microambiente complejo en esta zona. Los recuentos bacterianos totales medidos en las secreciones vaginales se aproximan a 100.000 bacteria/mL, predominando como microorganismos facultativos los bacilos de Döderlein cuya concentración empieza a aumentar al final del sangrado o inicio de la etapa estrogénica y disminuye a mitad del ciclo menstrual, cuando inicia el aumento de la progesterona [31-33]. En este estudio no se pudo establecer si la variación de la microbiota vaginal en el frotis aportado por las voluntarias estaba asociada a cambios en la etapa del ciclo menstrual dado que solo en tres de las voluntarias se pudo establecer en que ciclo del período menstrual se encontraban.

Por otra parte, los microorganismos patógenos también se nutren del glucógeno. Algunas especies de *Candida* en su forma de levadura no son patógenas, pero en su forma micelar (presencia de hifas y pseudohifas) pueden producir alteraciones vaginales. Este crecimiento anormal de *Candida* spp. se debe frecuentemente a una disminución en la concentración de bacilos de Döderlein, los cuales mantienen el pH normal de la vagina [34]. Las hifas y pseudohifas de *Candida* spp., además de contribuir a la acidez de la vagina, producen una inflamación local debido a su fijación al epitelio vaginal y mediante la producción de numerosas sustancias tóxicas que inducen la producción y liberación de proteasas celulares que destruyen el tejido epitelial y fosfolipasas que alteran la estructura de los fosfolípidos. Luego, estos cambios también afectan la persistencia de los espermatozoides en la vagina [35,36]. Estas alteraciones estuvieron probablemente presentes en aquellas muestras con frotis vaginal anormal, en las que la presencia de levaduras e hifas no se atribuyeron a una posible contaminación de las muestras, puesto que se cumplió no solo con la temperatura de almacenamiento temporal sino con el tiempo máximo de estabilidad a temperatura de refrigeración (4 °C máximo por 24 horas). Además, previo al procesamiento el investigador encargado se percató de que los aplicadores no presentaran un color o apariencia anormal.

Una marcada reacción leucocitaria afecta la persistencia de espermatozoides dado que aquellos que permanecen en vagina no escapan de la degradación enzimática y de los efectos del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o de los iones de superóxido (O_2^-) producidos por los leucocitos que son, en gran medida, responsables de la acción microbicida y de la actividad citotóxica en la vagina [37]. Esta respuesta fisiológica y comportamiento metabólico de la microbiota vaginal podría explicar los resultados de una baja proporción de muestras, en las cuales se evidenció un aumento en la reacción leucocitaria. Sin embargo, para futuros trabajos es necesario considerar cuantificar el número de leucocitos por campo en el frotis vaginal, que permita evaluar si un mayor número de espermatozoides por campo tiene alguna relación con un recuento bajo de leucocitos por preparación.

Todos los antecedentes dan evidencia que el microambiente vaginal es poco favorable para los espermatozoides, por lo que el efecto amortiguador del pH del fluido seminal contribuye a la persistencia de los espermatozoides en la vagina. Dentro de los primeros ocho segundos de la eyaculación se ha reportado un incremento del pH vaginal hasta 7,0. Master y colaboradores (1979) [38] midieron en forma seriada el pH vaginal después del coito y demostraron que permanece por encima de 6,0 en promedio hasta dos días después del coito. En la vagina también se encuentra el moco endocervical, producido por las células no ciliares a través de un mecanismo de secreción merocrina, en el cual la célula espermática permanece intacta y cuya producción se encuentra bajo el control hormonal del ciclo menstrual. El moco estrogénico, es decir, el predominante en los primeros 14 días del ciclo menstrual, es abundante, acuoso, delgado en consistencia, claro, acelular y apoya la penetración y sobrevivencia de los espermatozoides. Por su parte, el moco cervical progestagénico es escaso, grueso, opaco, celular, inhibe la penetración espermática e impacta en la persistencia de los espermatozoides. Luego, este componente también es una variable a considerar en la persistencia de los espermatozoides en la vagina [39]. No obstante, hay que tener presente que en la práctica de la investigación forense de violencia sexual las muestras vaginales se recolectan sin el uso de espéculo, por lo que el moco endocervical es una variable que no es posible de tener presente al momento de valorar los factores que afectan la persistencia de espermatozoides [19].

En la literatura revisada, el máximo de tiempo reportado para la detección de espermatozoides en la vagina es variado. Davies y Wilson (1974) [5], al igual que Willot y sus colaboradores (1982, 1986) [11,12], han reportado un tiempo de detección de siete días, mientras que para otros como Pollak (1943) [3] alcanza hasta los 17 días. En general, se ha reportado que a medida que aumenta el intervalo de tiempo poscoital la proporción de muestras en las cuales se detectan espermatozoides disminuye [4]. En términos generales por encima de los seis a siete días la mayoría de las muestras son negativas [5,11,14,15]. Los resultados de este estudio fueron consistentes con varios de los reportados previamente, en los que la persistencia de estructuras espermáticas en la cavidad vaginal llega hasta los cinco y siete días.

Los resultados de este estudio mostraron que el tiempo crítico al cual se estabiliza la variabilidad en el conteo de espermatozoides es el tercer día (72 horas); sin embargo, esto no significa que no se tengan muestras con un conteo espermático por debajo de los cinco espermatozoides por campo, recuento que puede verse afectado por la forma de recolectar la muestra (sin espéculo a través de una cavidad virtual), por el proceso de recorte del aplicador para la extracción, por el proceso de extracción y preparación permanente de las placas coloreadas

así como la experticia del analista [7,40]. De aquí la importancia de la adherencia a los protocolos estandarizados de trabajo, el entrenamiento del analista en la técnica y la evaluación de la incertidumbre del método, los cuales son lo que definen el valor probatorio del hallazgo de espermatozoides en vagina en un presunto asalto sexual. Con relación a este último punto, en la revisión bibliográfica realizada para la redacción de este manuscrito no se encontró trabajo alguno que valide un protocolo en particular para la evaluación de la persistencia de espermatozoides en la vagina para su uso en la investigación en criminalística y ciencias forenses.

Conclusiones

La detección de espermatozoides en muestras involucradas en asaltos sexuales es un marcador biológico contundente para definir una eyaculación reciente y da la oportunidad de llevar a cabo los estudios de genética forense cuando se cuenta con muestras para el debido cotejo [19,20]. De aquí la importancia de la celeridad en la toma de muestras y de la valoración de los factores que afectan la persistencia de los espermatozoides en la vagina, dado que hasta el momento es la única técnica de certeza de eyaculación reciente para el proceso judicial.

La mayoría de las sentencias en casos de delito sexual se están dictando con base en la prueba aportada por los médicos legistas o de servicios de salud a través de su informe técnico médico legal o historia clínica. Sin embargo, estos reportes tienen una incertidumbre muy alta incluso entre expertos legistas. Los desgarros o laceraciones sanan rápidamente y, excepto en lesiones extensas, pueden no dejar huella [16-18], por tanto, es posible que muchos casos se estén quedando sin el respaldo de buenos estudios científicos forenses que ayuden a la Fiscalía a corroborar el contacto sexual reciente y, en consecuencia, obtener el material genético que permita la identificación del autor, información que es decisiva para la definición de las sentencias.

Agradecimientos

A todas las mujeres voluntarias que aceptaron participar en este estudio, a los profesores Ofelia Flórez y Víctor Hugo Dueñas de la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle y a la Bióloga Cinthya Saldaña, quienes apoyaron el desarrollo de este trabajo de investigación. Finalmente, a la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle por la financiación de este proyecto bajo el radicado 1637.

Bibliografía

1. Bryson CK, Garlo AM, Piner SC. Vaginal swabs: endogenous and postcoital components. *J Forensic Sci Soc* 1989; 29: 157-171.
2. Quispe Mayta SE, Tarifa Espinoza S, Solíz Pacheco R, Sierra Gareca A. Investigación forense del fluido seminal en víctimas de violencia sexual, por el Laboratorio de Biología Forense. *BIOFARBO* 2010; 18: 91-95.
3. Pollak OJ. Semen and seminal stains. *Arch Pathol* 1943; 35: 140-196.
4. Dziak R, Parker L, Collins V, Johnston S. Providing Evidence Based Opinions On Time Since Intercourse (TSI) Based On Body Fluid Testing Results Of Internal Samples. *Can Soc Forensic Sci J* 2011; 44: 59-69.
5. Davies A, Wilson E. The persistence of seminal constituents in the human vagina. *Forensic Sci* 1974; 3: 45-55.
6. Rupp JC. Sperm survival and prostatic acid phosphatase activity in victims of sexual assault. *J Forensic Sci* 1969; 14: 177-183.
7. Allard JE, Baird A, Davidson G, Jones S, Lewis J, McKenna L, et al. A comparison of methods used in the UK and Ireland for the extraction and detection of semen on swabs and cloth samples. *Sci Justice* 2007; 47: 160-167.

8. Allard JE. The collection of data from findings in cases of sexual assault and the significance of spermatozoa on vaginal, anal and oral swabs. *Sci Justice* 1997; 37: 99-108.
9. Soules MR, Pollard AA, Brown KM, Verma M. The forensic laboratory evaluation of evidence in alleged rape. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130: 142-147.
10. Sharpe N. The Significance of Spermatozoa in Victims of Sexual Offences. *Can Med Assoc J* 1963; 89: 513-514.
11. Willott GM, Allard JE. Spermatozoa—their persistence after sexual intercourse. *Forensic Sci Int* 1982; 19: 135-154.
12. Willott GM, Crosse MA. The detection of spermatozoa in the mouth. *J Forensic Sci Soc* 1986; 26: 125-128.
13. Morrison AI. Persistence of spermatozoa in the vagina and cervix. *Br J Vener Dis* 1972; 48: 141-143.
14. Haimovici F, Anderson DJ. Detection of semen in cervicovaginal secretions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 8: 236-238.
15. Kobus HJ, Sileniaks E, Scharnberg J. Improving the effectiveness of fluorescence for the detection of semen stains on fabrics. *J Forensic Sci* 2002; 47: 819-823.
16. Makoroff KL, Brauley JL, Brandner AM, Myers PA, Shapiro RA. Genital examinations for alleged sexual abuse of prepubertal girls: findings by pediatric emergency medicine physicians compared with child abuse trained physicians. *Child Abuse Negl* 2002; 26: 1235-1242.
17. Gray-Eurom K, Seaberg DC, Wears RL. The prosecution of sexual assault cases: correlation with forensic evidence. *Ann Emerg Med* 2002; 39: 39-46.
18. Tucker S, Claire E, Ledray LE, Werner JS, Claire E. Sexual assault evidence collection. *Wis Med J* 1990; 89: 407-411.
19. República de Colombia, Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses. Reglamento técnico para el abordaje forense integral de la víctima en la investigación del delito sexual. 2009. Disponible: <http://www.medicina-legal.gov.co/documents/48758/78081/RI.pdf/33c02064-1556-47c7-93ba-80caa5d4117c>. Consultado: marzo 2015.
20. Salcedo-Cifuentes M. Manejo de la evidencia física de posible fuente biológica. Cali, Colombia: Programa Editorial Universidad del Valle; 2007.
21. Cicchetti DV. Testing the normal approximation and minimal sample size requirements of weighted kappa when the number of categories is large. *Appl Psychol Meas* 1981; 5: 101-104.
22. Estados Unidos de América, Estado de Virginia, Virginia Department of Forensic Science. Forensic Biology Section. Procedures Manual Section II: Presumptive and Confirmatory Tests for Biological Substances. 2014. Disponible: <http://www.dfs.virginia.gov/wp-content/uploads/2014/07/210-D300-FB-PM-II-Presumptive-and-Confirmatory-Tests-for-Biological-Substances.pdf>. Consultado: junio 2014.
23. De Roy PG. Helsinki and the Declaration of Helsinki. *World Med J* 2004; 50: 9-11.
24. Eungprabhanth V. Finding of the spermatozoa in the vagina related to elapsed time of coitus. *Z Rechtsmed* 1974; 74: 301-304.
25. Sensabaugh GF. Isolation and characterization of a semen-specific protein from human seminal plasma: a potential new marker for semen identification. *J Forensic Sci* 1978; 23: 106-115.
26. Graves HC, Sensabaugh GF, Blake ET. Postcoital detection of a male-specific semen protein. Application to the investigation of rape. *N Engl J Med* 1985; 312: 338-343.
27. Larsen B, Galask RP. Vaginal microbial flora: composition and influences of host physiology. *Ann Intern Med* 1982; 96: 926-930.
28. Hale GE, Zhao X, Hughes CL, Burger HG, Robertson DM, Fraser IS. Endocrine features of menstrual cycles in middle and late reproductive age and the menopausal transition classified according to the Staging of Reproductive Aging Workshop (STRAW) staging system. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3060-3067.
29. Melis GB, Ibba MT, Steri B, Kotsonis P, Matta V, Paoletti AM. [Role of pH as a regulator of vaginal physiological environment]. *Minerva Ginecol* 2000; 52: 111-121.
30. Bartlett JG. Quantitative bacteriologic of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977; 127: 8015-8021.
31. Farage MA, Miller KW, Sobel JD. Dynamics of the Vaginal Ecosystem-Hormonal Influences. *Infect Dis Res Treat* 2010; 3: 1-15.
32. Lee M-LT, Ross RA, Delaney ML, Onderdonk AB. Predicting Abnormal Microbial Population Levels in the Vaginal Ecosystem. *Microb Ecol Health Dis* 2011; 7.
33. Linhares IM, Giraldo PC, Baracat EC. [New findings about vaginal bacterial flora]. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 370-374.
34. Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women. *J Microbiol* 2007; 45: 515-520.
35. República Argentina, Fundacion Bioquímica Argentina, Programa de Salud Sexual y Reproductiva PROSAR. Manual de Procedimiento BACOVA. 2012. Disponible: <http://www.fba.org.ar/programas/prosar/Manual-Procedimiento-BACOVA-26-6-2012.pdf>. Consultado: mayo 2014.
36. Pavletic AJ, Hawes SE, Geske JA, Bringe K, Polack SH. Experience with routine vaginal pH testing in a family practice setting. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004; 12: 63-68.
37. Vogelpoel FR, Verhoef J. Activation of Polymorphonuclear Leukocytes by Spermatozoa. *Arch Androl* 1985; 14: 123-131.
38. Masters WH, Johnson VE, Kolodny RC, Tullman GD. In vivo evaluation of an effervescent intravaginal contraceptive insert by simulated coital activity. *Fertil Steril* 1979; 32: 161-165.
39. Evans JP, Kopf GS. Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* 1998; 30: 297-307.
40. Giles RC. Improved Methods for the Elution and Extraction of Spermatozoa From Sexual Assault Swabs. *Forensic Magazine* 2008; 5: 14-21.