

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

**EVALUACIÓN DE TRES DILUTORES SEMINALES EMPLEADOS
PARA CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN Y
CRIOPRESERVACION DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS DE
CUYES (*Cavia porcellus*) OBTENIDAS DEL EPIDÍDIMO**

PRESENTADO POR:

Br. EYNAR HUILLCA CAHUATA

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

ASESORES:

Ing. Ph.D. GONZALO WLADIMIR GONZALES
APARICIO

Ing. CÉSAR DOMINGO ORDOÑEZ RODRÍGUEZ

Financiado por el programa “YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ” - UNSAAC

CUSCO - PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: **EVALUACIÓN DE TRES DILUTORES SEMINALES EMPLEADOS PARA CONSERVACIÓN EN REFRIGERACIÓN Y CRIOPRESERVACION DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS DE CUYES (*Cavia porcellus*) OBTENIDAS DEL EPIDÍDIMO.**

Presentado por: **EYNAR HUILLCA CAHUATA** con DNI Nro.: **75227053**

Para optar el título profesional/grado académico de **INGENIERO ZOOTECNISTA**

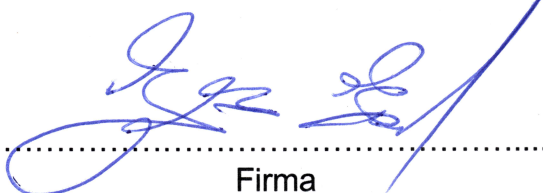
Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por (01) veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de **8%**.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 21 de Enero de 2025



Firma

Post firma Ing. Ph.D. GONZALO WLADIMIR GONZALES APARICIO

Nro. de DNI 1er Asesor: 41285829

ORCID del Asesor: 0000-0002-4682-6591

Nro. de DNI 2do Asesor: 23885311

ORCID del Asesor: 0000-0002-2955-4555

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: **OID:**
27259:422169347

Tesis Eynar Huillca Cahuata - L. O_.pdf

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:422169347

Fecha de entrega

20 ene 2025, 1:04 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

20 ene 2025, 1:17 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

Tesis Eynar Huillca Cahuata - L. O..pdf

Tamaño de archivo

1.6 MB

142 Páginas

44,436 Palabras

221,021 Caracteres

8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 20 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 8%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 5%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
550 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

Dedicado a mi amada madre, Flora Cahuata Cahuana, a mis queridos hermanos Julder Quispe Cahuata, Flor de Maria Huillca Cahuata, Lucy Marshall Huillca Cahuata y Gianela Yadira Huillca Cahuata, por su apoyo inquebrantable, comprensión profunda y motivación constante que me han brindado para lograr cada una de metas.

Asimismo, extendiendo mi reconocimiento a mis Padrinos, Americo Espirilla Calsina y Margarita Taype Tacuri, cuyas palabras de aliento y sabios consejos han sido de inspiración para lograr y construir cada una de mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo y sincero agradecimiento:

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, así como a los distinguidos docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia por su excelencia y dedicación las cuales han sido fundamentales en mi formación como profesional.

A mis asesores el Ing. PhD. Gonzalo Wladimir Gonzales Aparicio e Ing. César Domingo Ordoñez, por su apoyo, paciencia y tiempo dedicado. Gracias por compartir sus conocimientos y experiencias.

Al M.V. PhD. Manuel José More Montoya por su respaldo constante y por proporcionar facilidades necesarias que hicieron posible la realizar esta investigación.

A mis amigos, y con especial mención a Ayde Diaz Chirinos, cuyo apoyo durante la ejecución de esta investigación ha sido invaluable. Su amistad y colaboración han enriquecido significativamente mi camino académico.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
GLOSARIO DE TÉRMINOS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	2
2.1. PREGUNTA GENERAL.....	2
2.2. PREGUNTAS ESPECÍFICAS	2
III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	3
3.1. OBJETIVOS.....	3
3.1.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.2. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. HIPOTESIS	5
4.1. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....	5
4.1.1. HIPÓTESIS GENERAL.....	5
4.1.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	5
4.2. HIPOTESIS ESTADÍSTICAS O DE TRABAJO	6
4.2.1. EN MUESTRAS FRESCAS	6
4.2.2. EN MUESTRAS REFRIGERADAS.....	6
4.2.3. EN MUESTRAS CRIOPRESERVADAS	6
4.2.4. EFECTO DEL PROCEDIMIENTO DE CONSERVACIÓN	6
V. MARCO TEÓRICO	8
5.1. GENERALIDADES DEL CUY	8
5.2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL CUY MACHO	8

5.2.1.	TESTÍCULO	9
5.2.2.	VÍAS ESPERMÁTICAS.....	10
5.2.3.	GLÁNDULAS ACCESORIAS	11
5.2.4.	PENE.....	12
5.3.	ESPERMATOGÉNESIS.....	12
5.4.	MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN	13
5.4.1.	VAGINA ARTIFICIAL.....	13
5.4.2.	ELECTROEYACULACIÓN	13
5.4.3.	RECUPERACIÓN <i>POST MORTEM</i>	14
5.5.	DILUCIÓN SEMINAL Y CONSERVACIÓN PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	14
5.5.1.	DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES	14
5.5.2.	TIPOS DE DILUYENTES	15
5.5.3.	MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE SEMEN.....	16
5.6.	SEMEN DEL CUY	17
5.6.1.	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE CUY .	18
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1.	LUGAR DEL EXPERIMENTO	22
6.2.	DURACIÓN DEL ESTUDIO	22
6.3.	MATERIALES Y EQUIPOS	22
6.3.1.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	22
6.3.2.	REACTIVOS Y MEDIOS	23
6.3.3.	EQUIPO DE LABORATORIO	23
6.4.	UNIDADES EXPERIMENTALES.....	24
6.5.	MÉTODO DE COLECCIÓN DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS.....	24
6.6.	DILUCIÓN DE MUESTRAS	25
6.7.	EMPAJILLADO, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN	26

6.8.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE MUESTRAS SEMINALES.....	26
6.9.	VARIABLES DE ESTUDIO.....	29
6.9.1.	VARIABLES INDEPENDIENTES	29
6.9.2.	VARIABLES DEPENDIENTES	29
6.10.	ANÁLISIS Y DISEÑO ESTADÍSTICO	30
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1.	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS FRESCAS DE CUYES	32
7.1.1.	VITALIDAD ESPERMÁTICA	32
7.1.2.	FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	34
7.1.3.	MOTILIDAD ESPERMÁTICA	36
7.1.4.	VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL	37
7.2.	CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE MUESTRAS REFRIGERADAS POR 24 HORAS DE CUYES.....	39
7.2.1.	VITALIDAD ESPERMÁTICA	39
7.2.2.	FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	40
7.2.3.	MOTILIDAD ESPERMÁTICA	41
7.2.4.	VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL	43
7.3.	CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS DE CUYES.....	44
7.3.1.	VITALIDAD ESPERMÁTICA	44
7.3.2.	FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA	45
7.3.3.	MOTILIDAD ESPERMÁTICA	46
7.3.4.	VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL	47
7.4.	EFFECTO DE LOS PROCEDIMIENTOS DE REFRIGERACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS DE CUYES ..	49
VIII.	CONCLUSIONES	54

IX.	RECOMENDACIONES	55
X.	BIBLIOGRAFÍA	56
XI.	ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración promedio de muestras de semen de cuy según diferentes autores	18
Tabla 2. Motilidad total promedio de muestras de semen de cuy según diferentes autores	19
Tabla 3. Vitalidad promedio de muestras de semen de cuy según diferentes autores	20
Tabla 4. Componentes para la elaboración del dilutor TRIS - yema de huevo	25
Tabla 5. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas).....	32
Tabla 6. Funcionalidad de membrana de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas).....	35
Tabla 7. Motilidad de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas).....	36
Tabla 8. Vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas).....	38
Tabla 9. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy conservadas 24 horas en refrigeración con tres dilutores.	40
Tabla 10. Funcionalidad de membrana de muestras espermáticas de cuy conservadas 24 horas en refrigeración con tres dilutores	41
Tabla 11. Motilidad de muestras espermáticas de cuy conservadas en refrigeración por 24 horas con tres dilutores	42

Tabla 12. Vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas de cuy conservadas en refrigeración por 24 horas con tres dilutores	43
Tabla 13. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy criopreservadas con tres dilutores.....	44
Tabla 14. Funcionalidad de membrana de muestras espermáticas de cuy criopreservadas con tres dilutores.....	46
Tabla 15. Motilidad de muestras espermáticas criopreservadas con tres dilutores.	47
Tabla 16. Vitalidad e integridad acrosomal muestras espermáticas criopreservadas con tres dilutores.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor de cuy macho.....	9
Figura 2. Esquema de clasificación de vitalidad e integridad acrosomal de espermatozoides de cuy.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Fotografía de la clasificación de vitalidad e integridad acrosomal en espermatozoides de cuy.....	37
Figura 4. Vitalidad de muestras espermáticas en función al momento de evaluación con tres dilutores.....	49
Figura 5. Funcionalidad de membrana (HOST Test) de muestras espermáticas en función al momento de evaluación con tres dilutores.....	50
Figura 6. Motilidad de muestras espermáticas en función al momento de evaluación con tres dilutores.....	51
Figura 7. Vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas en función al momento de evaluación con tres dilutores.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Peso vivo de los cuyes evaluados.....	68
Anexo 2. Concentración de las muestras espermáticas evaluadas.	69
Anexo 3. Fotografías de los parámetros evaluados en las muestras espermáticas.	70
Anexo 4. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad en muestras espermáticas en un tiempo de exposición inicial (0 Horas).....	73
Anexo 5. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides con reacción HOS positiva, en muestras a tiempo de exposición inicial (0 Horas).....	75
Anexo 6. Análisis de varianza para el porcentaje de motilidad total en muestras espermáticas en un tiempo de exposición inicial (0 Horas).....	77
Anexo 7. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides ViCA en muestras espermáticas en un tiempo de exposición inicial (0 Horas).....	79
Anexo 8. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C	81
Anexo 9. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides con reacción HOS Positiva en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C	83
Anexo 10. Análisis de varianza para el porcentaje de motilidad total en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C	85
Anexo 11. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides ViCA en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C	87
Anexo 12. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad en muestras criopreservadas en LN2.....	89
Anexo 13. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides con reacción HOS Positiva en muestras criopreservadas en LN2	91

Anexo 14. Análisis de varianza para el porcentaje de motilidad total en muestras espermáticas criopreservadas en LN2.....	93
Anexo 15. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides ViCA en muestras espermáticas criopreservadas en LN2.....	95
Anexo 16. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad por efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2.....	97
Anexo 17. Análisis de varianza para el porcentaje espermatozoides con reacción HOS Positiva, considerando el efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2.....	104
Anexo 18. Análisis de varianza para el porcentaje motilidad total, considerando el efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2.....	112
Anexo 19. Análisis de varianza para el porcentaje espermatozoides ViCA, considerando el efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2.....	120

GLOSARIO DE TÉRMINOS

fps:	Fotograma por segundo
DS:	Desviación estándar
LN2:	Nitrógeno líquido
MuCA:	Espermatozoides muertos con acrosoma intacto
MuSA:	Espermatozoides muertos sin acrosoma
PL:	Progresivo lento
PM:	Progresivo medio
PR:	Progresivo rápido
spz:	Espermatozoide
ST:	Estáticos
SL:	Solución de lavado
VCL:	Velocidad de curvilínea
ViCA:	Espermatozoides vivos con acrosoma intacto
ViSA:	Espermatozoides vivos sin acrosoma
μl:	Microlitro

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo comparar el efecto de tres dilutores (TRIS – yema, OptiXcell®, AndroMed®), sobre las características microscópicas de muestras espermáticas refrigeradas y criopreservadas de cuyes que fueron obtenidas del epidídimo. Se utilizaron dieciséis pares de testículos de cuyes de líneas comerciales con pesos de entre 1,000 – 1,500 gr. Se distribuyeron en tres tratamientos TRIS – yema + SL (T1), OptiXcell® + SL (T2) y AndroMed® + SL (T3). Se evaluaron parámetros como la vitalidad espermática con colorante eosina, funcionalidad de membrana con el HOS Test, vitalidad e integridad acrosomal con el procedimiento de tinción doble (Trypan Blue - Giemsa), y motilidad espermática con el software computarizado Sperm Motility Tracker V2. Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial. Para las muestras frescas se aplicó un DBCA, mientras que para las muestras refrigeradas a 5°C durante 24 horas y criopreservadas se realizó un análisis de covarianza. Así mismo, se utilizó un análisis con medidas repetidas para evaluar el efecto de los procedimientos de refrigeración y criopreservación. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en vitalidad, funcionalidad de membrana y vitalidad e integridad acrosómica entre los dilutores en muestras frescas y refrigeradas a 24 horas ($p>0.05$). Sin embargo, las muestras espermáticas diluidas con OptiXcell® + SL tuvieron mayor motilidad espermática respecto a las muestras diluidas con los dilutores TRIS – yema + SL y AndroMed® + SL ($p<0.05$). Además, se encontraron diferencias en vitalidad espermática entre las muestras criopreservadas de cuy que fueron diluidas con TRIS – yema + SL, OptiXcell® + SL y AndroMed® + SL ($p<0.05$), pero no hubo diferencias significativas en la funcionalidad de membrana, motilidad y vitalidad e integridad acrosomal ($p>0.05$). Se concluye que el dilutor OptiXcell® + SL tuvo mejor desempeño en conservar las cualidades de las muestras espermáticas de cuyes en condiciones de refrigeración, sin embargo, en las muestras criopreservadas, ninguno de los tres dilutores pudo mantener las características espermáticas que fueron evaluadas.

Palabras clave: Muestra espermática, cuy, características microscópicas, dilutores, refrigeración, criopreservación.

ABSTRACT

The present study aimed to compare the effect of three diluents (TRIS – Yolk, OptiXcell®, AndroMed®) on the microscopic characteristics of refrigerated and cryopreserved sperm samples from guinea pigs obtained from the epididymis. Sixteen pairs of testicles from commercial guinea pig lines weighing between 1000 - 1500g were used. They were distributed into three treatments: TRIS – Yolk + SL (T1), OptiXcell® + SL (T2), and AndroMed® + SL (T3). Parameters such as sperm vitality with the eosin stain, membrane functionality with the HOS Test, vitality and acrosomal integrity with the double staining procedure (Trypan Blue - Giemsa), and sperm motility with the computerized software Sperm Motility Tracker V2 were evaluated. The obtained data were analyzed using descriptive and inferential statistics. A DBCA was applied to the fresh samples, while a covariance analysis was conducted for the samples refrigerated at 5°C for 24 hours and those that were cryopreserved. Additionally, a repeated measures analysis was employed to evaluate the effect of the refrigeration and cryopreservation procedures. No statistically significant differences were found in vitality, membrane functionality, and vitality and acrosomal integrity between diluents in fresh samples and those refrigerated for 24 hours ($p>0.05$). However, sperm samples diluted with OptiXcell® + SL showed higher sperm motility compared to samples diluted with TRIS – Yolk + SL and AndroMed® + SL diluents ($p<0.05$). Furthermore, differences in sperm vitality were found among cryopreserved guinea pig samples diluted with TRIS – Yolk + SL, OptiXcell® + SL, and AndroMed® + SL ($p<0.05$), but there were no significant differences in membrane functionality, motility, and acrosomal vitality and integrity ($p>0.05$). It is concluded that the OptiXcell® + SL diluent performed better in preserving the qualities of guinea pig sperm samples under refrigeration conditions. However, in cryopreserved samples, none of the three diluents could maintain the evaluated sperm characteristics.

Keywords: Sperm sample, guinea pig, microscopic characteristics, diluents, refrigeration, cryopreservation.

I. INTRODUCCIÓN

El cuy o cobayo (*Cavia porcellus*) es un mamífero roedor, del cual, en base al recuento de restos se especula que el cuy fue domesticado hace más de 3,600 años atrás y que formó parte de la cultura Paracas siendo este un recurso importante para su alimentación, de la misma manera este espécimen se originó y distribuyó en la zona andina de Perú, Ecuador, Bolivia y Colombia, adaptándose y desenvolviéndose productivamente muy bien, siendo el Perú el principal productor y consumidor de este roedor (Chauca, 1997).

MINAGRI (2012) indica que, a nivel nacional, el 93% de los productores de cuyes maneja un sistema de producción familiar, más de un 6% un sistema familiar-comercial y menos de 1% un sistema comercial. Sin embargo, rescatando datos más actuales, en regiones como Cajamarca y Cusco, las cuales tienen la mayor producción de cuyes a nivel nacional, se maneja en su mayoría un sistema de producción familiar comercial y solo entre un 0.5 a 2.2% realizan una producción netamente comercial, los cuales en su mayoría son provenientes de zonas rurales (Ortiz *et al.*, 2021). En sistemas de producción de cuyes ya sean estos de media o grande escala, se busca mejorar las características reproductivas y productivas para lo cual se aplican diferentes tecnologías con el fin de alcanzar un progreso genético en el tiempo (Castro, 2002). Por ende, en aras de mejorar los índices productivos en esta especie es fundamental la realización de diferentes estudios en temas reproductivos y productivos y así evaluar diferentes alternativas para la toma de decisiones convenientes en base a generar mayor rentabilidad y productividad (Cruz y Tiparra, 2018).

El uso de diluyentes para la crioconservación y refrigeración del semen proporciona el máximo aprovechamiento de la capacidad reproductiva de un reproductor, para ello los diluyentes deben preservar funcionales las características seminales y por ende mantener los niveles de fertilidad adecuados (Gadea, 2003). Por lo expuesto, la presente investigación se fundamenta en establecer alternativas en el uso de tres dilutores para la refrigeración y criopreservación de muestras espermáticas de cuy colectado del epidídimo y su efecto sobre la calidad espermática.

II. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

2.1. PREGUNTA GENERAL

¿Existe alguna variación en la capacidad de conservación de tres dilutores seminales sobre muestras espermáticas de cuyes obtenidas del epidídimo en condiciones frescas, refrigeradas y criopreservadas?

2.2. PREGUNTAS ESPECÍFICAS

- a.** ¿Cuál es el efecto del empleo de tres dilutores seminales sobre las características microscópicas de muestras espermáticas frescas de cuyes recuperadas del epidídimo?
- b.** ¿Cuál es el efecto del empleo de tres dilutores seminales sobre las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes luego de 24 horas de conservación en refrigeración a 5°C?
- c.** ¿Cuál es el efecto del empleo de tres dilutores seminales sobre las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes luego de ser criopreservadas en nitrógeno líquido?
- d.** ¿Cuál es el efecto de los procedimientos de refrigeración y criopreservación sobre las características de microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes recuperadas del epidídimo con tres dilutores diferentes?

III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de tres dilutores seminales empleados para conservación en condiciones frescas, refrigeradas y criopreservadas de muestras espermáticas de cuyes obtenidas del epidídimo.

3.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a.** Comparar el efecto del empleo de tres dilutores seminales sobre las características microscópicas de muestras espermáticas frescas de cuyes recuperadas del epidídimo.
- b.** Comparar el efecto del empleo de tres dilutores seminales sobre las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes luego de 24 horas de conservación en refrigeración a 5°C.
- c.** Comparar el efecto del empleo de tres dilutores seminales sobre las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes luego de ser criopreservadas en nitrógeno líquido.
- d.** Evaluar el efecto de los procedimientos de refrigeración y criopreservación sobre las características de microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes recuperadas del epidídimo con tres dilutores diferentes.

3.2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la mejora de la calidad genética de los cuyes ha generado que se eleve la producción en unidades de más de 18 millones, permitiendo alzas en las tasas de rentabilidad en más de 800,000 familias, en su mayoría de la región sierra con producciones de pequeña y media escala (INIA, 2020).

Según Ugalde (2014), las biotecnologías reproductivas son un conjunto de técnicas dirigidas a incrementar la eficiencia reproductiva en animales, al mismo tiempo se destaca su importancia debido a que son de utilidad como herramientas en la aplicación de biotecnologías de mayor innovación (Gonzáles y Gonzáles, 2005). Una de las biotecnologías más pioneras es la inseminación artificial, definida como aquella técnica en la cual se aplica el semen dentro del tracto genital de la hembra para la fecundación en el momento efectivo (Giraldo, 2007).

La inseminación artificial en la cavicultura no se ha desarrollado a profundidad debido a la dificultad en la obtención y procesamiento del semen, encontrándose trabajos de colecta por electroeyaculación (Aragón, 2019; Pinduisaca, 2018) y por extracción de epidídimo de cuyes *post mortem* (Mise, 2014); del mismo modo (Cruz y Tiparra, 2018) reportan datos del empleo de diluyentes para la conservación de semen en conejos criollos.

El uso de biotecnologías reproductivas en la producción cavícola es aún muy limitada y poco investigada, pese a ser el cuy una de las especies pecuarias de mayor relevancia a nivel nacional, por ende, es necesaria su investigación y experimentación para posteriormente avalar su práctica a nivel productivo.

En base a esto y al panorama actual, se planteó el presente trabajo de investigación con el fin de evaluar la capacidad de conservación de la calidad seminal de una serie de tres dilutores en refrigeración y criopreservación de muestras espermáticas colectadas de epidídimo, considerando este trabajo como punto clave para emplearlo posteriormente en la inseminación artificial (IA).

IV. HIPOTESIS

4.1. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

4.1.1. HIPÓTESIS GENERAL

El empleo de tres dilutores seminales evaluados permite la conservación de características microscópicas que determinan la calidad de muestras seminales de cuyes, tanto en condiciones de refrigeración como en condiciones de criopreservación en nitrógeno líquido.

4.1.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- a.** El empleo de los tres dilutores seminales evaluados, permiten conservar las características microscópicas de las muestras frescas de espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo.
- b.** El empleo de los tres dilutores seminales evaluados, permiten conservar las características microscópicas de las muestras de espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo, luego de 24 horas de conservación en refrigeración a 5°C.
- c.** El empleo de los tres dilutores seminales evaluados, permiten conservar las características microscópicas de las muestras de espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo, luego ser criopreservadas en nitrógeno líquido.
- d.** Los procedimientos de refrigeración y criopreservación deterioran las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes recuperados del epidídimo, a pesar del uso de tres diferentes dilutores en estas.

4.2. HIPOTESIS ESTADÍSTICAS O DE TRABAJO

4.2.1. EN MUESTRAS FRESCAS

H₀ = Los promedios de características microscópicas de las muestras frescas de espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo diluidos con los dilutores evaluados, son iguales.

H_a = Al menos uno de los promedios de características microscópicas de las muestras frescas de espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo diluidos con los dilutores evaluados, es diferente del resto.

4.2.2. EN MUESTRAS REFRIGERADAS

H₀ = Los promedios de características microscópicas de las muestras refrigeradas por 24 horas a 5°C de los espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo diluidos con los dilutores evaluados, son iguales.

H_a = Al menos uno de los promedios de características microscópicas de las muestras refrigeradas por 24 horas a 5°C de los espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo diluidos con los dilutores evaluados, es diferente del resto.

4.2.3. EN MUESTRAS CRIOPRESERVADAS

H₀ = Los promedios de características microscópicas de las muestras refrigeradas por 24 horas a 5°C de los espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo diluidos con los dilutores evaluados, son iguales.

H_a = Al menos uno de los promedios de características microscópicas de las muestras refrigeradas por 24 horas a 5°C de los espermatozoides de cuyes recuperados del epidídimo diluidos con los dilutores evaluados, es diferente del resto.

4.2.4. EFECTO DEL PROCEDIMIENTO DE CONSERVACIÓN

H₀ = Los promedios de las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes recuperados del epidídimo, conservadas en refrigeración a 5 °C y criopreservación, son iguales

Ha = Los promedios de las características microscópicas de las muestras espermáticas de cuyes recuperados del epidídimo, conservadas en refrigeración a 5 °C y criopreservación, son diferentes

V. MARCO TEÓRICO

5.1. GENERALIDADES DEL CUY

El cuy (*Cavia porcellus*) posee características morfológicas como un cuerpo alargado con una cabeza relativamente grande de forma cónica, de cuello grueso, tronco cilíndrico y de extremidades cortas. Los machos desarrollan más rápido y no existe el dimorfismo sexual (Chauca, 1997).

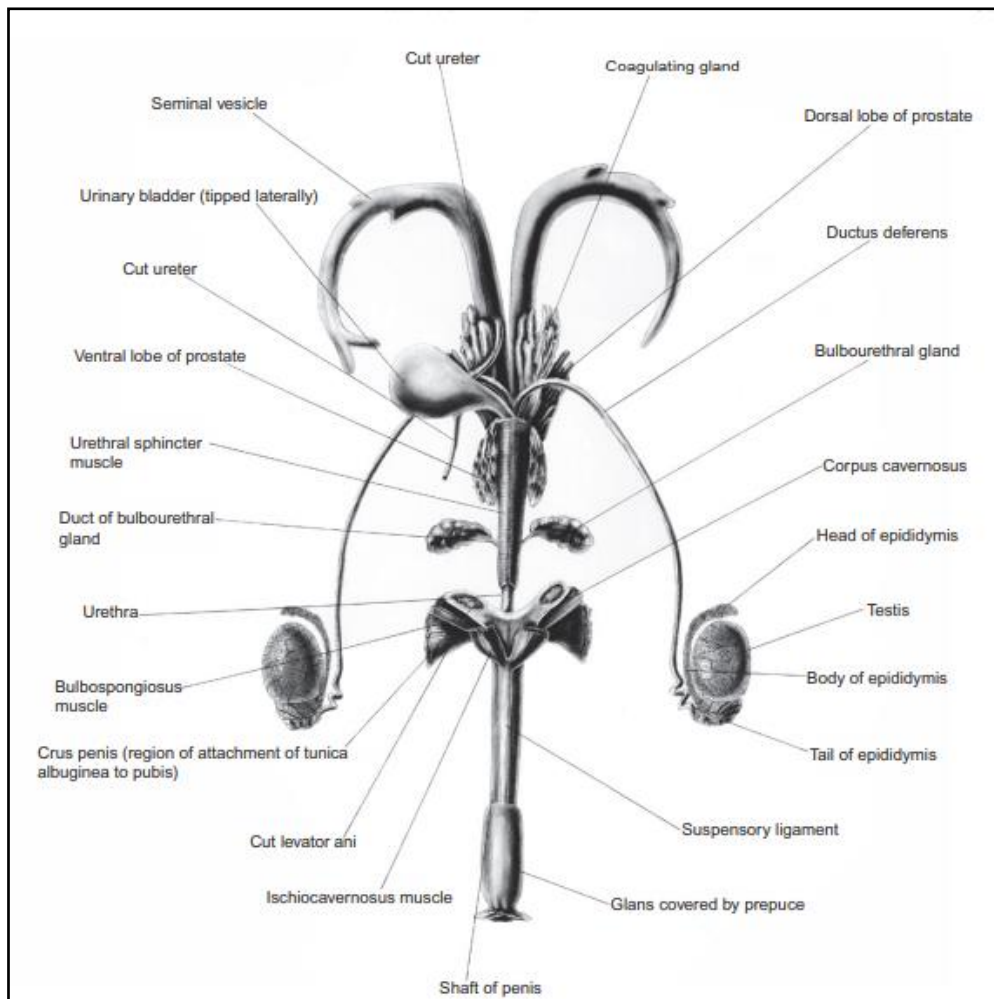
Rodríguez (1979), expone que el cuy es descendiente del cuy salvaje anteriormente conocidos como *Cavia cutleri*, y que fueron domesticados por poblaciones preincas, siendo el único animal domesticado junto con la llama destinado para consumo. El pelaje de los cuyes tiene una longitud y coloración muy variable, pero de pelo corto y liso con colores como alazán, naranja ocráceo, blanco, negro y gris en la mayoría de los casos y en ocasiones de pelo arrosado o lacio muy largo, y prácticamente esta domesticado en todo el mundo (Zúñiga *et al.*, 2002).

El cuy está clasificado taxonómicamente en la Clase Mammalia, Orden Rodentia, Suborden Hysticomorpha, Familia Caviidae, Género *Cavia* y Subespecie *Cavia porcellus* (Enciso, 1986).

5.2. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL CUY MACHO

El aparato reproductor del macho está conformado por los testículos, epidídimo, conducto deferente, glándulas vesiculares y bulbouretrales, uretra, próstata y el pene (Breazile y Brown, 1976).

El cuy macho desarrolla su madurez sexual consignando su anatomía reproductiva a los cuatro meses de edad, continuando este desarrollo hasta el año de edad, empleándose como reproductores cuando tengan un peso vivo mayor a 1.1 kg (Chauca, 1997).



Fuente: Hargaden y Singer (2012)

Figura 1. Aparato reproductor de cuy macho

5.2.1. TESTÍCULO

Los testículos son un par de órganos glandulares situados dentro del escroto y fuera de la cavidad abdominal, que tienen aproximadamente 15 mm de ancho y 25 mm de largo (Hargaden y Singer, 2012), se encuentran sostenidos por un mesorquio que pasa desde la superficie medial hasta el riñón (Breazile y Brown, 1976), y permanecen en las bolsas inguinales (escroto) (Quesenberry *et al.*, 2012).

Existen tres compartimentos en los testículos, el primero es la túnica albugínea que contiene a las células de Leydig encargadas de la producción de testosterona, seguida del segundo compartimento (peritubular) y está conformado por células mioides, fibras de colágeno y fibroblastos, los cuales en

conjunto constituyen la barrera hematotesticular, y por último los túbulos seminíferos que contienen a las células de Sertoli (Agüera *et al.*, 2018). Los testículos son considerados los órganos clave dentro del aparato reproductor del macho, debido a que tienen como función la producción de andrógenos y de células germinativas por medio de la espermatogénesis, las cuales están influidas considerablemente por el sistema neuroendocrino (Agüera *et al.*, 2018).

5.2.2. VÍAS ESPERMÁTICAS

a. Epidídimo

El epidídimo se divide en tres secciones: (1) cabeza, (2) cuerpo y (3) cola y en general está implantada a lo largo del margen dorsolateral del testículo (Breazile y Brown, 1976), mide 12 mm de largo por 9 mm de ancho, conformado por un tubo flexuoso que se presenta retraído entre sí de manera continua varias veces. La cabeza del epidídimo emerge desde el hilo del testículo, seguido del cuerpo que es la proyección caudal de la cabeza que se adhiere en el cuerpo dorsal del testículo, la cual consecuentemente forma la cola del epidídimo, del cual sale el conducto deferente formando así el plexo pampiniforme (Zúñiga y Quisiyupanqui, 1995). Las dos primeras secciones del epidídimo (cabeza y cuerpo) son responsables de la maduración espermática, mientras que la última sección (cola del epidídimo) se destina para su almacenamiento, conteniendo hasta el 75% de las células espermáticas. Esta última sección del epidídimo brinda un ambiente adecuado que favorece un aumento en la capacidad fecundante de los espermatozoides. Así mismo, la motilidad de los espermatozoides se aumenta progresivamente durante su tránsito en las diferentes secciones del epidídimo (Hafez y Hafez, 2002).

b. Conducto deferente

El conducto deferente es de forma tubular, inician en la cola del epidídimo y desembocan en la uretra, presentando mayor grosor en sus porciones terminales (Zúñiga y Quisiyupanqui, 1995), mientras que, en sus segmentos proximales, su recorrido es moderadamente tortuoso, llegando a tener aproximadamente un diámetro de 1.5 a 2.5 mm y presentando un color blanquecino (Stan, 2015).

Al igual que el epidídimo, funciona como espacio de almacenamiento de espermatozoides en menor proporción, sin embargo, su función principal es de transporte conectando el epidídimo con el conducto eyaculador de la uretra (Frandsen, 1988).

5.2.3. GLÁNDULAS ACCESORIAS

a. Vesículas seminales

Denominadas también glándulas vesiculares, son dos de color blanco traslúcido con una longitud de 100 mm y de 6 a 9 mm de diámetro, siendo la glándula accesoria más grande (Hargaden y Singer, 2012), con una apariencia tubiforme, cilíndrica y vermiforme ubicadas en dirección dorsal a la vejiga y ventrales con los uréteres, así mismo están relacionadas de manera directa con la próstata, dispuestas cráneo-dorsalmente en el lóbulo dorsal de la próstata (Stan, 2015). Responsables de la secreción del mayor volumen del eyaculado, de aspecto blanco y amarillo, las vesículas seminales producen fructosa y prostaglandinas, que sirven como fuente energética para los espermatozoides y estimulan la contracción del músculo liso en machos durante la eyaculación y en hembras dentro del útero facilitando así el transporte de los espermatozoides respectivamente (Agüera *et al.*, 2018).

b. Glándulas bulbouretrales

Es una glándula par en forma de sacos, sus medidas son de 8 mm de largo y 5 mm de ancho, ubicados en el tercio posterior de la uretra en ambos lados (Zúñiga y Quisiyupanqui, 1995), en el segmento del arco isquiático de la uretra, dorsal a la sínfisis del pubis y ventral al recto, cada una de ellas conectados a la uretra por un solo conducto (Stan, 2015). Al momento de la erección esta glándula produce una secreción mucosa translúcida que contiene pequeños carbohidratos encargados de envolver y lubricar la uretra (Mega y Umi, 2021).

c. Próstata

La próstata también es una glándula anexa formada por dos lóbulos, adosados a la región caudal de las vesículas seminales, cada uno de estos lóbulos mide de largo 19 mm y 9 mm de ancho (Zúñiga y Quisiyupanqui, 1995). Su función es

incrementar el volumen de eyaculado o semen al incorporar una secreción lechosa de baja densidad y con un pH alcalino, además, contiene gran cantidad de enzimas, hexosas, fosfatasas, glicoproteínas, lípidos y proteínas. En roedores el pH es relativamente más ácido (6.5) y contiene enzimas responsables de la mucólisis del semen (glucoronidasa, fibrinolisisina y diesterasa) (Agüera *et al.*, 2018). La estructura y función de la próstata al igual que las vesículas seminales está condicionada por los niveles de testosterona en el individuo (Mega y Umi, 2021).

d. Glándulas coagulantes

Encargadas coagular la secreción de las vesículas seminales formando así un tapón copulatorio que impide el reflujo del semen y que la hembra sea fecundada por otros machos, dicho tapón se elimina horas después, logrando confirmar de esta manera la cópula (Martan y Shepherd, 1976).

5.2.4. PENE

Es el órgano copulador o aparato genital externo, compuesto por el pene y el escroto, cuya función es servir de canal para la introducción del semen (líquido seminal y espermatozoides) dentro del aparato reproductor de la hembra (Agüera *et al.*, 2018).

Stan (2015) describe que el pene del cuy tiene dos porciones, el cuerpo del pene y su glándula, con una longitud de 45 a 85 mm y entre 4 a 7 mm de circunferencia tiene forma de “S” y está ubicado ventralmente en la sínfisis púbica. El glándula es cilíndrico y redondeado cuya superficie tiene de escamas distribuidas uniformemente, por otro lado, el *os penis* está conformado por tejido óseo esponjoso y se encuentra dentro de toda la longitud del pene (Márquez *et al.*, 2019). El prepucio, también conocido como vaina está conformada por un recubrimiento de tejido fibroso muscular (Zúñiga y Quisiyupanqui, 1995).

5.3. ESPERMATOGÉNESIS

Los espermatozoides son el producto de las gónadas del macho (testículos), cuya producción inicia desde la pubertad, este proceso se conoce como la espermatogénesis y comprende la producción, desarrollo y transformación de

los espermatozoides (células genéticas de los machos) la cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos. La espermatogénesis implica una serie de divisiones mitóticas, la cual se divide en tres fases: La espermatocitogénesis, donde ocurre específicamente las divisiones mitóticas de las espermatogonias sucesivamente dando lugar a los espermatoцитos primarios; meiosis, donde se divide de los espermatoцитos primarios a secundarios y espermátides; y espermiogénesis, donde ocurre la especificación fisiológica y morfológica de las espermátides a espermatozoides, y la duración de este ciclo varia en cada especie (Ávalos *et al.*, 2018). En los cuyes este todo este ciclo tiene una duración aproximada de 50 días (Pinduisaca, 2018).

5.4. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN

La inseminación artificial es un método altamente eficiente y eficaz que posibilita un máximo aprovechamiento del macho reproductor. Sin embargo, es esencial llevar a cabo con precisión las etapas de recolección, evaluación e inseminación para lograr resultados superiores (Agüera *et al.*, 2018).

5.4.1. VAGINA ARTIFICIAL

La colecta por vagina artificial es uno de los métodos más preferidos en especies como bovinos, equinos, ovinos y caprinos, debido a que se controla en mejor medida las condiciones para el depósito del semen dentro de la vagina artificial, lo que a su vez permite coleccionar muestras con características adecuadas y representativas (Ávalos *et al.*, 2018).

En cuyes, (Castro *et al.*, 2019) diseñaron un prototipo de vagina artificial utilizando tubo PVC de 4 cm de largo y 3 cm de ancho, revestido con una funda de látex y cubierto con un maniquí de piel de cuy y además contaba con un termostato para mantener una temperatura adecuada y constante. No obstante, no se reportaron resultados positivos en cuanto a la eficacia de la monta.

5.4.2. ELECTROEYACULACIÓN

Este método se basa en la recolección de semen mediante la descarga de pulsos eléctricos a las glándulas accesorias (próstata y vesículas seminales, etc.) mediante un electrodo introducido en el recto. La electroeyaculación resulta

efectiva en especies silvestres, en cautiverio y en general, en animales que no han sido entrenados para eyacular mediante el uso de una vagina artificial (Ávalos *et al.*, 2018).

Cabeza (2019) empleó este método en cuyes, con la finalidad de realizar evaluaciones morfométricas y morfológicas de muestras seminales, con un electroeyaculador conectado a un transductor de 0.4 cm de diámetro y 6 cm de largo incrementando los pulsos de manera constante desde 2 a 8 voltios, para llegar al pico de estimulación, obteniendo adecuados resultados. De la misma manera Benavides *et al.* (2020) validaron este método de colección, logrando definir características microscópicas y macroscópicas en muestras obtenidas de cuyes.

5.4.3. RECUPERACIÓN *POST MORTEM*

La recuperación de material genético *post mortem* o por orquiectomía de testículos en animales permite obtener muestras espermáticas de excelente calidad, que posteriormente podrían emplearse para la inseminación artificial. Este procedimiento implica realizar una incisión en la región caudal de la cola del epidídimo y del conducto deferente haciendo uso de un bisturí (Ávalos *et al.*, 2018).

Mise (2014) evaluó muestras criopreservadas colectadas de epidídimo lavados o recuperados con 0.5 ml de diluyente. De igual forma, Quispe (2018) empleó este método para evaluar las muestras seminales de dos líneas genéticas de cuyes, concluyendo que las características microscópicas son similares en ambas líneas.

5.5. DILUCIÓN SEMINAL Y CONSERVACIÓN PARA LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

5.5.1. DILUYENTES Y CRIOPROTECTORES

En la dilución de semen se brinda las condiciones óptimas a los espermatozoides para mantener su vitalidad y capacidad fecundante en el transcurso del tiempo, asegurando de este modo la máxima tasa de fertilización sin desperdiciar espermatozoides (Gandarillas y Quispe, 2021). Estas sustancias denominadas

“diluyentes, dilutores o extenders” deben cumplir con requerimientos como: aporte de nutrientes, prevenir cambios de pH, conservar el balance de electrolitos y la presión osmótica, impedir la colonización de microorganismos y mantener los espermatozoides funcionales para su posterior uso (Kandelousi *et al.*, 2013).

Los crioprotectores permiten mantener tejidos o células en temperaturas bajas por periodos prolongados, que generalmente son compuestos químicos, evitando la formación de cristales internos al potenciar la deshidratación celular. Los crioprotectores se clasifican en permeables y no permeables; los primeros son de bajo peso molecular y permeables, desplazando el agua celular por la membrana espermática de los cuales el glicerol es el más empleado y el etilenglicol con las mejores tasas en la criopreservación. Los crioprotectores no penetrantes tienen alto peso molecular y son no permeables a la membrana plasmática, generan un gradiente osmótico deshidratando la célula, entre las más comunes se tiene la glucosa y sacarosa (López *et al.*, 2012).

Raju *et al.* (2021) indicaron que los crioprotectores como el glicerol son tóxicos cuando son empleados individualmente, respecto al uso de combinaciones de estos, lo que los hace inadecuados, ineficientes e ineficaces para muchos tipos de células.

5.5.2. TIPOS DE DILUYENTES

Se clasifican en dos grupos, (1) de corto plazo que conserva el semen de uno a tres días y (2) los que son de largo plazo conservando el semen por cuatro días a más.

a. Diluyentes de corto plazo

Empleado cuando los lugares de distribución o empleo de las muestras seminales requiere desplazamientos cortos. Son de bajo costo en su elaboración, además logra con pocas recolecciones de semen más inseminaciones. Los más comunes son el citrato de sodio, yema de huevo, leche descremada o en polvo (Cuenca y Avellaneda, 2017).

b. Diluyentes de largo plazo

Es recomendable para lugares donde el punto de colección y de la utilización del semen son distantes siendo esta una de las principales ventajas transportándola a largas distancias mejorando su distribución, permite analizar y diagnosticar las muestras seminales determinando la calidad del semen para su posterior uso, además, requiere para compensar la pérdida en la viabilidad por envejecimiento tener que utilizar altas concentraciones de espermatozoides (Rueda *et al.*, 2009 citado por Cuenca y Avellaneda, 2017).

Benavides *et al.* (2020) empleando como dilutor el citrato de sodio al 3% diluido en agua bidestilada, observaron un 18.26% de anomalías en las muestras de semen colectados por electroeyaculación, pero en general las características macro y microscópicas tuvieron valores muy altos. Por el contrario, Suárez *et al.* (2020) reportaron que el uso de citrato sódico, dextrosa y acetato potásico proporcionaron menor capacidad en la conservación de semen en refrigeración y además diluyentes compuestos por azúcares y por leche descremada protegieron las muestras espermáticas de forma más eficiente.

El empleo de agua de coco como dilutor descrito por Rosero *et al.* (2018) tuvo buen desempeño frente a combinaciones de leche con yema de huevo y aloe vera en conejos, puesto que el uso de yema de huevo al igual que la mayoría de dilutores compuestos por productos biológicos conllevan riesgos sanitarios (Ahmad *et al.*, 2008) y que en la composición del agua de coco escasamente hay fosfolípidos los cuales por acción de las fosfolipasas encontradas en secreciones de las glándulas bulbouretrales permiten un mayor deterioro de los espermatozoides (Ferreira, 1993).

5.5.3. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE SEMEN

a. Refrigeración

Denominado también como preservación hipotérmica, el cual permite conservar los gametos en temperaturas de 0 a 4°C durante periodos de 24 a 72 horas. Es necesario añadir dilutores en la refrigeración para proteger a los

espermatozoides, demostrando mejores resultados empleando yema de huevo (Ávalos *et al.*, 2018).

Gonzales (1988), reportó que los espermatozoides de cuy pueden permanecer viables durante 11 días en refrigeración a 4°C en la cola del epidídimo, y durante este periodo los espermatozoides no experimentan una disminución en su capacidad de fecundación. Así mismo la refrigeración de semen a 4°C hasta por 48 horas previas a la congelación no redujeron la calidad seminal en comparación con muestras congeladas (Batista *et al.*, 2013).

b. Criopreservación o congelación

Consiste principalmente en la congelación y almacenamiento de los espermatozoides a temperaturas muy bajas como el caso del nitrógeno líquido (-196°C). Esta es una herramienta fundamental en la aplicación de biotecnologías reproductivas (Marcantonio, 2021). El objetivo de la criopreservación es preservar la viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas y durante periodos largos de tiempo (López *et al.*, 2012), además permite reducir las necesidades de espacio en el manejo reproductivo aminorado por la menor tenencia de individuos machos, la conservación por largos periodos de tiempo y el transporte a largas distancias (González y González, 2005). Son pocas las técnicas de conservación de semen que posibilitan supervivencias elevadas de muestras espermáticas (Ávalos *et al.*, 2018). Sin embargo, Gonzales y Gonzales (2008), señalan que los espermatozoides sobrevivientes a condiciones de estrés hipotérmico prolongado lograron fecundar ovocitos maduros en cuyes.

5.6. SEMEN DEL CUY

El semen está constituido por espermatozoides y secreciones producidas por las glándulas sexuales accesorias siendo el primero el de mayor importancia, y es producido por el aparato genital del macho (Morales y Vega, 1983).

No existen diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de los testículos (izquierdo y derecho) de los cuyes (Rosales *et al.*, 2021), así mismo la producción de espermática junto con el tamaño testicular tienen una correlación

positiva alta, por ende, el tamaño testicular llega a considerarse un indicador adecuado en la producción de semen (Milán *et al.*, 2013).

Benavides *et al.* (2020) reportaron en promedio 0.67 ml de volumen de semen de cuy siendo este valor superior a los obtenidos por Paredes *et al.* (2020) en cuyes mejorados con un valor promedio de 0.47 ml, ambos reportes descritos empleando el método de colecta por electro eyaculación.

5.6.1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE CUY

a. Concentración espermática

Es la determinación del número de espermatozoides contenidos en un determinado volumen de semen, el cual se mide empleando el hematocitómetro, un colorímetro o también un espectrofotómetro (Hafez y Hafez, 2002).

Tabla 1. Concentración promedio de muestras de semen de cuy según diferentes autores

Autor (es)	Método de Colección	Concentración (x10 ⁶ esp/ml)
Freund (1969)	Electroeyaculación	13.38
Unchupaico <i>et al.</i> (2022)	Orquiectomía	49.39
Lloor (2015)	Orquiectomía	25.68
Tapia y Tello (2016)	Orquiectomía	38.70
Aragón (2019)	Electroeyaculación	21.33
Cabeza (2019)	Electroeyaculación	17.62
Benavides <i>et al.</i> (2020)	Electroeyaculación	36.70
Cabeza <i>et al.</i> (2020)	Electroeyaculación	47.33
Paredes <i>et al.</i> (2020)	Electroeyaculación	12.5

Fuente: Autores citados

b. Motilidad espermática

Entre los criterios de motilidad, se considera la motilidad masal de los espermatozoides, observándose esta, mediante la formación de olas con una escala del 1 – 5 la cual está relacionada directamente con la concentración

espermática. También es usual observar la motilidad progresiva individual de los espermatozoides, que determina el tipo de movimiento de estos (rectilíneo y continuo) en términos de porcentaje consignando como mínimo aceptable un 50% (Paez, 2011).

Además, la motilidad según Ávalos *et al.* (2018) se clasifica como:

- Muy buena: 80-100%
- Buena: 60-79%
- Regular: 40-59%
- Pobre: <40%

Tabla 2. Motilidad total promedio de muestras de semen de cuy según diferentes autores

Autor (es)	Método de colección	Motilidad (%)
Freund (1969)	Electroeyaculación	66.00
Unchupaico <i>et al.</i> (2022)	Orquitectomía	42.00
Mise (2014)	Orquitectomía	73.00
Loor (2015)	Orquitectomía	73.50
Tapia y Tello (2016)	Orquitectomía	57.50
Quispe (2018)	Electroeyaculación	91.00
Aragón (2019)	Electroeyaculación	47.17
Cabeza (2019)	Electroeyaculación	69.40
Benavides <i>et al.</i> (2020)	Electroeyaculación	90.81
Paredes <i>et al.</i> (2020)	Electroeyaculación	88.50

Fuente: Autores citados

c. Vitalidad espermática

Esta evaluación sirve para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos por medio de la tinción con eosina-nigrosina, siendo este el método más utilizado, esta coloración tiene lugar en los espermatozoides muertos, mas no es los vivos porque su membrana está intacta. Este parámetro junto con la motilidad, morfología, metabolismo energético, integridad estructural y la

funcionalidad de membrana espermática están relacionadas directamente (Cabeza, 2019).

Tabla 3. Vitalidad promedio de muestras de semen de cuy según diferentes autores

Autor (es)	Método de colección	Vitalidad (%)
Cabeza (2019)	Electroeyaculación	72.65
Mise (2014)	Orquiectomía	70.00
Loor (2015)	Orquiectomía	86.70
Tapia y Tello (2016)	Orquiectomía	41.50
Aragón (2019)	Electroeyaculación	74.80
Cabeza <i>et al.</i> (2020)	Electroeyaculación	72.65

Fuente: Autores citados

d. Funcionalidad de membrana (HOS test)

La evaluación de la funcionalidad de membrana plasmática se realiza con la prueba de HOST (hypo-osmotic swelling test) evalúa la funcionalidad de la membrana plasmática, valorando la permeabilidad de las membranas, el cual se realiza cuando las muestras se encuentran en un medio hipoosmolar. Se considera un espermatozoide funcionalmente activo cuando la membrana se hincha y el flagelo o cola se risa, debido a la membrana plasmática no permite la salida de sustancias que sean osmóticamente activas compensado un desequilibrio osmótico absorbiendo agua lo que la hace funcionalmente activa, y es no funcional cuando no presenta estos cambios (López *et al.*, 2012).

Respecto a valores de la funcionalidad de membrana en muestras de espermatozoides de cuyes colectados por electroeyaculación, se tiene un 96.66 $\pm$ 3.30% (Aragón, 2019).

e. Vitalidad e integridad acrosomal

El acrosoma es una estructura membranosa con forma de capuchón, se genera a partir del aparato de Golgi. Contiene enzimas liposómicas (hialuronidasa), enzimas proteolíticas (acrosina) e hidratos de carbono. Estas enzimas en

conjunto facilitan el reconocimiento y la penetración del espermatozoide a través de las envolturas del ovocito, contribuyendo así al proceso de fecundación (López *et al.*, 2012).

La evaluación conjunta de vitalidad y la integridad acrosomal es un parámetro que indica la proporción de espermatozoides vivos con capacidad fecundante, por lo que es imprescindible la evaluación de este parámetro (Pérez *et al.*, 2020). Sin embargo, solo se tiene reportes de estudios sobre la integridad acrosomal en espermatozoides de cuyes, donde Aragón (2019) y al igual que Quispe *et al.* (2021) obtuvieron valores de 96.57% y 87.90% respectivamente.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. LUGAR DEL EXPERIMENTO

El presente estudio tuvo lugar en la unidad de producción de cuyes de la escuela profesional de Zootecnia y en el laboratorio de Fisiología Animal pertenecientes a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Facultad de Agronomía y Zootecnia, escuela profesional de Zootecnia, localizadas en el distrito de San Jerónimo provincia de Cusco, región Cusco.

6.2. DURACIÓN DEL ESTUDIO

La investigación tuvo una duración de 120 días.

6.3. MATERIALES Y EQUIPOS

6.3.1. MATERIALES DE LABORATORIO

- Guantes quirúrgicos
- Kit de cirugía
- Vaso precipitado 100 ml
- Cubetas Coplín
- Probeta 100 y 50 ml
- Piseta
- Bagueta
- Micropipetas graduables
- Tips de micropipeta
- Placas Petri
- Porta y cubre objetos
- Pajillas 0.5 ml
- Cámara Neubauer
- Microviales
- Tubos cónicos con tapa rosca

- Micrómetro
- Termómetro
- Termo de descongelado
- Hervidor eléctrico
- Caja de poliestireno expandido
- Cooler
- Balanza digital

6.3.2. REACTIVOS Y MEDIOS

- Agua estéril (Agua de inyección)
- Agua destila/desmineralizada
- Dilutor OptiXcell®
- Dilutor AndroMed®
- Ácido cítrico monohidratado
- D-Fructosa
- Tris(hidroximetil)amino-metano
- Citrato sódico
- Eosina
- Trypan Blue
- Giemsa solución madre
- Alcohol al 70 y 96%
- Alcohol Polivinílico

6.3.3. EQUIPO DE LABORATORIO

- Baño maría
- Platina caliente
- Microscopio Trinocular
- Cámara DHMI 48 Mpx
- Termocupla

- Refrigeradora

6.4. UNIDADES EXPERIMENTALES

La muestra de estudio estuvo constituida por 16 de cuyes de líneas comerciales, criadas en el Centro Agronómico K'ayra (Líneas: Roja, Baya y Blanca), comúnmente denominadas como líneas: Perú, Inti y Andino respectivamente, en referencia a las líneas generadas por el INIA Perú (Chauca, 1997); con pesos de entre 1,000 – 1,500 g., cada uno fue sometido clínicamente a una evaluación de órganos genitales y comportamiento reproductivo, de los cuales se utilizaron ambos testículos. Así mismo, los cuyes empleados para la evaluación fueron sometidos a un proceso de apareamiento (empadre) dos a tres días previos a la colecta de muestras. Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de propiciar el vaciado de los espermatozoides viejos y deteriorados favoreciendo, de este modo, la existencia de nuevos espermatozoides jóvenes en el epidídimo. Dicha práctica contribuye a la estandarización y a la representatividad apropiada de las muestras espermáticas (Lombardi, 2018). Los dilutores como unidades experimentales se distribuyeron como: TRIS - yema de huevo + SL (T1), OptiXcell® + SL (T2) y AndroMed® + SL (T3).

6.5. MÉTODO DE COLECCIÓN DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS

Aprovechando el beneficio mensual programado que se realiza en la unidad de producción de cuyes del centro agronómico K'ayra, se recuperaron ambos testículos de 16 cuyes, mediante el procedimiento denominado orquiectomía que consiste en realización de una incisión transversal en los sacos escrotales y posterior extirpación. Los testículos fueron codificados, almacenados y trasladados en un cooler hasta el laboratorio de trabajo en un lapso de tiempo no mayor a 15 minutos con el fin de prevenir alteraciones en las características microscópicas. La colección se realizó por recuperación de epidídimos *post mortem* para lo cual, primero se separó la cola del epidídimo del testículo, luego en una placa Petri se diseccionó la cola del epidídimo con cortes profundos, seguidamente se realizó el lavado con 2.5 ml de solución de lavado (consistente en dilutor OptiXcell® preparado) para cada cola de epidídimo de ambos testículos. Esta elección se fundamentó en base a que en los ensayos

preexperimentales el dilutor OptiXcell® empleado como solución de lavado (SL), preservó de manera más efectiva las características microscópicas de las muestras frescas y refrigeradas, permitiendo de este modo mantener valores representativos de la muestra a analizar desde el momento del lavado o recuperación de la muestra espermática, minimizando así las variaciones degenerativas en las muestras para las evaluaciones posteriores, según el protocolo descrito por García, (2000). Finalmente, la muestra recuperada se vació en un tubo cónico milimetrado para su asignación a los distintos tratamientos mediante alícuotas del mismo volumen.

6.6. DILUCIÓN DE MUESTRAS

Se emplearon dos dilutores comerciales (OptiXcell® y AndroMed®), los cuales se utilizaron en base a sus especificaciones técnicas. El dilutor AndroMed® incluye lecitina de soja como fuente de fosfolípidos, Tris(hidroximetilaminometano), ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, glicerina, agua ultra pura y antibióticos (tilosina, gentamicina, espectinomicina, lincomicina) (Minitube international, s. f.). Por otro lado, el dilutor OptiXcell® está compuesto por liposomas sintetizados, Tris, azúcares, antioxidantes, glicerina y agua ultra pura (IMV Technologies, s. f.). Además, se empleó un dilutor seminal elaborado a base de TRIS - yema de huevo, el cual se preparó en base el protocolo descrito por Souza (2009). Las muestras recuperadas fueron fraccionadas en tres alícuotas para cada tratamiento las cuales fueron diluidas respecto a la concentración espermática que presenta cada muestra (Anexo 1).

Tabla 4. Componentes para la elaboración del dilutor TRIS - yema de huevo

Componentes	Cantidad
Tris(hidroximetil)amino-metano (g)	3.025
Ácido cítrico monohidratado(g)	1.7
D-fructosa (g)	1.25
Yema de huevo (%)	20
Agua destilada (ml)	100

Fuente: Souza (2009)

6.7. EMPAJILLADO, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN

La muestra diluida a una concentración de diez millones de espermatozoides y equilibrada por 24 horas en refrigeración (5°C) fue vaciada en pajillas de 0.57 ml y sellada con alcohol polivinílico. La congelación se realizó por medio de vapores de nitrógeno líquido (LN2) según el protocolo descrito por Viñán *et al.* (2019), donde se colocaron las pajillas sobre una rejilla a 4 cm por encima del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno extendido durante 7 minutos hasta llegar a -140°C y finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido (-196°C). Por último, la descongelación se realizó sumergiendo en agua a 37°C por 20 segundos en un termo descongelador.

6.8. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE MUESTRAS SEMINALES

Las características microscópicas de las muestras, que determinan la calidad espermática, se evaluaron de manera inicial después su dilución, a 24 horas en refrigeración y post - descongelación. Dentro de las evaluaciones realizadas por observación directa, se optó por no contemplar dentro de las evaluaciones aquellos campos de visión donde había demasiada acumulación de células espermáticas (fenómeno Rouelaux), debido a que esta condición dificultaba la diferenciación de las células espermáticas para cada uno de los parámetros evaluados, permitiendo de esta manera que los datos obtenidos fueran lo más representativos y confiables.

Se efectuaron las siguientes evaluaciones:

a. Concentración espermática

Se realizó después del procedimiento de recuperación y lavado del epidídimo, diluyendo la muestra seminal colectada con agua estéril en un micro vial con un factor de dilución de 1:10, seguidamente se colocó 15 µL de la muestra diluida a cada retículo de la cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática (Anexo 3). Esta evaluación se realizó para estandarizar las muestras tanto en su dilución con los dilutores en estudio y para su criopreservación en pajillas de 0.57 ml con una concentración de 10 millones de espermatozoides.

b. Motilidad espermática

La motilidad se evaluó tomando videos (≥ 30 fps/s) de las muestras con una cámara HDMI 48X en un microscopio trinocular a 4X conectado a un computador, para lo cual se emplearon 25 μL de muestras previamente diluidas las cuales fueron precalentadas en una platina caliente a 38°C por 10 segundos. Dichas grabaciones fueron analizadas con el Software (Sperm Motility Tracker V. 2.0) (Buchelly, 2018), previo al análisis, para un mayor reconocimiento de espermatozoides, se aplicaron filtros de color invertido de imagen a cada una de las grabaciones con el reproductor de video VLC media player (Anexo 3). Para cada muestra evaluada se registró y analizó la información obtenida de tres videos, estos datos obtenidos se utilizaron en el análisis estadístico respectivo.

Las especificaciones del Software Sperm Motility Tracker V.2.0. para la clasificación de los espermatozoides fue la siguiente:

- Estáticos: $\text{VCL} < 10 \mu\text{m/s}$.
- Progresivos lentos: $10 < \text{VCL} < 45 \mu\text{m/s}$.
- Progresivos Medios: $45 < \text{VCL} < 75 \mu\text{m/s}$.
- Rápidos: $\text{VCL} > 75 \mu\text{m/s}$.

VCL: Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayecto en función del tiempo.

c. Vitalidad espermática

La vitalidad se evaluó empleando el colorante eosina, homogenizando 10 μL de muestra diluida (suspensión espermática) y 5 μL de eosina en el extremo de un portaobjetos haciendo un frotis y luego fijándolas con la platina caliente a 38°C y corriente de aire. Los portaobjetos con las muestras fijadas, fueron colocados en un microscopio binocular para su observación a 400X. De esta manera, se realizó la cuantificación de no menos de 200 espermatozoides, clasificándolos como vivos aquellos espermatozoides translucidos (No se tiñen con el colorante) y muertos a los de color rojo (Anexo 3).

d. Funcionalidad de membrana plasmática (HOS test)

Para la prueba de endosmosis o test hiposmótico (HOST) se preparó la solución hipoosmótica con citrato de sodio y D-fructuosa bajo el protocolo descrito por Jeyendran *et al.* (1984). Se colocaron 30 μL de la muestra (suspensión espermática) y 200 μL de solución hipoosmótica en un micro vial para su incubación a 37.5°C en un baño maría durante 60 minutos. Luego de ello, se añadieron 10 μL del colorante eosina para mejorar la observación de los espermatozoides e inmediatamente después, se extrajeron 15 μL de muestra incubada para hacer un frotis que se evaluó empleando un microscopio binocular a 400X. Se cuantificaron no menos de 200 espermatozoides, clasificándolos de acuerdo a la observación, de endosmosis positiva a aquellos espermatozoides con flagelo enrollado, torcido helicoidalmente porque su membrana espermática está intacta y endosmosis negativa a espermatozoides de flagelo recto ya que su membrana espermática está dañada (Aragón, 2019) (Anexo 3).

e. Vitalidad e integridad acrosomal

Se realizó mediante la prueba de tinción doble (Trypan blue - Giemsa) descrita por Didion *et al.* (1989) y ajustado al protocolo de Iglesias *et al.* (2019), el cual es el siguiente:

- Incubar la muestra homogenizada de 20 μL de reactivo Trypan blue y 60 μL de la suspensión espermática.
- Realizar un frotis depositando 15 μL de la solución homogenizada e incubada en un portaobjetos sobre la platina caliente a 37.5°C.
- Sumergir el frotis en alcohol al 70% y luego con alcohol al 90% durante 10 a 15 segundos en cada caso para fijar las muestras. Posteriormente dejar secar sobre la platina caliente.
- Sumergir el frotis fijado en una cubeta coplin con solución Giemsa 10% durante 25 minutos.
- Después de la coloración, extraer el frotis y enjuagar con agua destilada dos o tres veces y dejar secar en la platina caliente.
- Finalmente, realizar la evaluación del frotis contando no menos de 200 espermatozoides.

La clasificación espermática para muestras espermáticas de cuyes se realizó del mismo modo, adaptando lo descrito por Didion *et al.* (1989):

- Vivos con acrosoma intacto (ViCA), espermatozoides sin tinción y con acrosoma remarcado.
- Vivos sin acrosoma (ViSA), espermatozoides sin tinción y sin acrosoma.
- Muertos con acrosoma (MuCA), espermatozoides teñidos y con acrosoma remarcado.
- Muertos sin acrosoma (MuSA), espermatozoides teñidos y sin acrosoma.

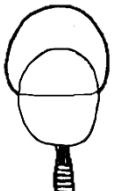
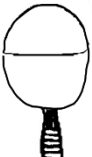
Clasificación			
ViCA	ViSA	MuCA	MuSA
			

Figura 2. Esquema de clasificación de vitalidad e integridad acrosomal de espermatozoides de cuy.

6.9. VARIABLES DE ESTUDIO

6.9.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Dilutor (OptiXcell® + SL (T1), AndroMed® + SL y TRIS - yema de huevo + SL)

6.9.2. VARIABLES DEPENDIENTES

- Vitalidad espermática
- Motilidad espermática
- HOST+ (funcionalidad de membrana plasmática)
- Vitalidad e integridad acrosomal

6.10. ANALISIS Y DISEÑO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial, empleando el análisis de varianza, para ello los datos fueron analizados mediante pruebas de normalidad de Shapiro Wilks y prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett con un alfa de 0.05.

6.10.1. Muestras frescas (0 horas)

Para el análisis de varianza de muestras frescas (0 horas de evaluación), se empleó un diseño en bloques completamente al azar (DBCA). Cuyo modelo aditivo lineal empleado fue siguiente:

$$y_{ij} = \mu + D_i + R_j + e_{ij}$$

Donde:

Y: Variable respuesta (Vitalidad, funcionalidad de membrana, motilidad, vitalidad e integridad acrosomal)

μ : Media o constante común

D_i : Efecto de dilutor de semen

R_j : Raza (Perú, Inti, Andino)

e_{ij} : residual

La comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey usando la librería AGRICOLAE del lenguaje de programación R.

6.10.2. Muestras Refrigeradas por 24 horas a 5°C y Criopreservadas en LN2

Para el caso de las muestras refrigeradas por 24 horas a 5 °C y criopreservadas en nitrógeno líquido, se empleó un análisis de covarianza el cual tiene el siguiente modelo aditivo lineal:

$$y_{ijk} = \mu + VP_i + D_j + R_k + e_{ijk}$$

Donde:

Y: Variable respuesta (Vitalidad, funcionalidad de membrana, motilidad, vitalidad e integridad acrosomal)

μ : Media o constante común
 VP_i: Valor previo obtenido (Covariable)
 D_j: Efecto de dilutor de semen
 R_k: Raza (Perú, Inti, Andino)
 e_{ij}: residual

Para la comparación de medias se usó la prueba de LSMEANS del paquete EMMMEANS del lenguaje de programación R.

6.10.3. Efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas en refrigeración y criopreservación en LN2

Para evaluar el efecto de conservación en refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservación en nitrógeno líquido, se efectuó un análisis de varianza con medidas repetidas cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + R_k + e_{ijk}$$

Donde:

Y: Variable respuesta (Vitalidad, funcionalidad de membrana, motilidad, vitalidad e integridad acrosomal)

μ : Media o constante común

T_i: Tiempo o momento de evaluación (Frescas “Tiempo 0”, refrigeradas “24 horas” y criopreservadas)

D_j: Efecto de dilutor de semen

R_k: Raza (Perú, Inti, Andino)

e_{ij}: residual

Para el análisis estadístico en este caso se utilizó una prueba de T con ajuste de Bonferroni, el cual se usó para ajustar el nivel de significancia de las comparaciones múltiples a fin de controlar la tasa de error tipo 1.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el lenguaje de programación de R v 4.20 y el programa RStudio versión (Desktop 2021.09.2+382).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS FRESCAS DE CUYES

7.1.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

Los resultados de vitalidad espermática de muestras de espermáticas de cuy empleando los tres dilutores, durante un tiempo de exposición inicial, indican que no hay diferencia estadística significativa entre estos ($p>0.05$), por lo tanto, la vitalidad de las muestras espermáticas en un periodo de exposición inicial con los tres dilutores son iguales (ver Tabla 5).

Tabla 5. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas)

DILUTOR	Promedio $\pm$ DS	C.V.	Max.	Min.
TRIS – yema + SL	52.24 $\pm$ 12.62 ^a	0.2416	77.46	23.50
OptiXcell® + SL	55.51 $\pm$ 10.49 ^a	0.1890	67.00	31.63
AndroMed® + SL	48.96 $\pm$ 10.97 ^a	0.2241	62.16	23.71

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variabilidad.

SL= Solución de lavado. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p<0.05$).

Resultados similares de vitalidad fueron reportados por Ayala *et al.* (2017), quienes obtuvieron 60.20% y 52.20 % en cuyes enteros y en cuyes a los que se les extirpo la espícula peneana respectivamente, empleando como dilutor el Holding Plus® (Medio de cultivo de embriones bovinos). Atribuyendo dicha similitud a que los animales en estudio eran jóvenes y que método de extracción de las muestras espermáticas era el mismo.

No obstante, a pesar de utilizar el mismo método de colecta, Quispe *et al.* (2021) obtuvieron resultados de vitalidad inferiores (34.86%). Esta diferencia podría estar vinculada al tipo de dilutor utilizado, ya que en su estudio emplearon un dilutor TRIS elaborado, mientras que, en el presente estudio, se utilizaron dos

diluyentes comerciales y un dilutor elaborado a base de TRIS con yema de huevo. Cabe destacar que la yema de huevo proporciona una protección efectiva a la membrana, lo que resulta en una mayor supervivencia de las células espermáticas (Cabrita *et al.*, 1998). Además, es relevante señalar que las muestras en el estudio de Quispe *et al.* (2021), se obtuvieron de una población sometida a estrés térmico debido a la aplicación de diferentes fotoperíodos, lo cual también podría tener un impacto negativo en la calidad de las muestras espermáticas, según lo referido por el mismo autor.

En contraste, Tapia y Tello (2016) registraron un 48.70 y 41.50% de vitalidad en cuyes criollos y mejorados en dos edades reproductivas respectivamente. Esta diferencia estaría relacionada al tipo de dilutor empleado y a un error subjetivo durante el conteo, ya que en dicho estudio se contó no menos de 100 células espermáticas, siendo lo más apropiado contar no menos de 200 células espermáticas para lograr proporciones y datos más representativos (López *et al.*, 2012), que fue lo que se hizo para el presente estudio. De igual manera, Qhishpe (2021) evaluando curvas de congelación en muestras espermáticas de cuy fresco y empleando dilutor OptiXcell® obtuvo 43.48 y 46.30 % de vitalidad, atribuyendo esos resultados a que se empleó dentro de la metodología el software AndroVision® (sistema computarizado para el análisis de espermatozoides - CASA), el cual brinda resultados más precisos y objetivos.

Por otro lado, Montenegro (2022) obtuvo resultados superiores, empleando el mismo método de colecta y tres diferentes dilutores (Triladyl®, AndroMed® y OptiXcell®). Estas discrepancias podrían ser explicadas específicamente por la metodología empleada dentro del proceso de colección de muestras, considerando que en dicho estudio se recuperaron los testículos mediante la orquiectomía en animales vivos, en cambio, en el presente estudio, la recuperación de testículos fue *post mortem*. Este enfoque estaría en línea con lo descrito por Hishinuma *et al.* (2003) quienes señalan que, tras la muerte del animal, los espermatozoides comienzan a degenerarse dentro del testículo, afectando así su viabilidad, más aún cuando transcurren largos periodos de tiempo desde la muerte del animal.

A su vez, Montenegro (2022) señala que, si existen diferencias en el porcentaje de vitalidad de espermatozoides de cuyes procesados con los dilutores AndroMed® (79.40%) y OptiXcell® (75.00%) respecto al dilutor Triladyl® (64.80%), no obstante, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas. Estas discrepancias estarían asociadas a que, en el estudio de Montenegro, las muestras espermáticas empleadas no se fraccionaron en alícuotas para su dilución con los tres dilutores en estudio. En su lugar, se utilizó un solo dilutor para cada muestra. Por lo que en dicho estudio no se estaría eliminando la fuente de variabilidad por efecto del animal, es decir las diferencias inherentes entre los animales utilizados, lo cual no reflejaría con precisión la capacidad de conservación de los dilutores debido a las características específicas de cada animal en dicho estudio, propiciando de este modo la obtención de resultados poco representativos (Gómez, 2021).

Por último, mediante una colección por electroeyaculación, Aragón (2019) y Cabeza (2019), reportaron valores vitalidad de superiores al 70%, considerándose a la vez superiores a los resultados obtenidos en el presente estudio. Esto cobra relevancia al tener en cuenta que la calidad y viabilidad espermática de muestras colectadas del epidídimo puede verse afectada debido a su alta probabilidad de contaminación por restos de tejido y sangre (Guerrero, 2006).

7.1.2. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

La prueba de membrana funcionalidad, permitió obtener valores de 26.04% de espermatozoides con membrana plasmática funcional en las muestras espermáticas diluidas con TRIS – yema + SL, 31.04% con OptiXcell® + SL y 28.99% en muestras diluidas con AndroMed® + SL, siendo estos valores estadísticamente iguales ($p>0.05$) (ver Tabla 6).

Tabla 6. Funcionalidad de membrana de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas)

DILUTOR	Promedio $\pm$ DS	C.V.	Max.	Min.
TRIS – yema + SL	26.04 $\pm$ 13.35 ^a	0.5127	54.37	10.14
OptiXcell® + SL	31.04 $\pm$ 15.45 ^a	0.4978	64.49	14.63
AndroMed® + SL	28.99 $\pm$ 10.99 ^a	0.3791	52.36	13.53

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variabilidad.

SL= Solución de lavado. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (p<0.05).

Aragón (2019), reportó un valor de 96.66% de espermatozoides con membrana plasmática funcional (HOS – Test) en muestras obtenidas por electroeyaculación. Del mismo modo Quispe *et al.* (2021) reportaron valores similares al emplear muestras colectadas el epidídimo (60.49%, 59.76% y 36.63%). Siendo estos sustancialmente más altos a los obtenidos en el presente estudio. Estas discrepancias podrían ser explicadas de acuerdo con la metodología empleada en dichos estudios, en los cuales se empleó una solución hipoosmótica a una concentración de 50 mOsm/l y se incubó durante cinco minutos, mientras que para el presente estudio la solución hipoosmótica tuvo una concentración de 100 mOsm/l. Todo esto estaría acorde a lo descrito por Bled *et al.* (2007) quienes, evaluando muestras espermáticas de conejos, señalan que las concentraciones de 60 mOsm/l de los medios hipoosmóticos son las más adecuadas para determinar la funcionalidad de membrana. Así mismo, Tapia y Tello (2016), empleando la misma concentración de la solución hipoosmótica a la del presente estudio, reportaron porcentajes inferiores de funcionalidad de membrana (16% – 18%). No obstante, esta disminución puede atribuirse al tiempo de incubación en dicho estudio, el cual fue de 30 minutos, mientras que en el presente estudio se incubaron las muestras durante 60 minutos. Dicha aseveración fue corroborada por Santiani *et al.* (2004), quienes señalan que el mejor tiempo de incubación y con mayor reacción de espermatozoides es de 60 minutos.

7.1.3. MOTILIDAD ESPERMÁTICA

En la Tabla 7, se muestran los resultados de motilidad total, espermatozoides progresivos rápidos (PR), progresivos medios (PM), progresivos lentos (PL) y estáticos (ST). En cuanto al porcentaje de motilidad total y al porcentaje de espermatozoides PR y ST, se encontraron diferencias ($p < 0.01$) entre las muestras diluidas con TRIS - yema + SL y AndroMed® + SL, respecto a aquellas diluidas con OptiXcell® + SL. De igual manera en el porcentaje de espermatozoides PM se encontraron diferencias ($p < 0.05$) entre los dilutores AndroMed® + SL y OptiXcell® + SL. Por último, en cuanto al porcentaje de espermatozoides PL, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los dilutores evaluados.

Tabla 7. Motilidad de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas)

Parámetros	Dilutor			
		TRIS – yema + SL	OptiXcell® + SL	AndroMed® +SL
	$\bar{X} \pm DS$	33.75 ± 7.97^b	50.82 ± 11.85^a	36.50 ± 11.96^b
Motilidad total	C.V.	0.2362	0.2332	0.3277
	Max.	48.72	67.50	63.00
	Min.	17.12	21.93	16.41
PR	$\bar{X} \pm DS$	20.42 ± 6.57^b	37.00 ± 12.75^a	23.18 ± 13.00^b
PM	$\bar{X} \pm DS$	7.20 ± 2.41^{ab}	8.19 ± 2.71^a	6.88 ± 1.93^b
PL	$\bar{X} \pm DS$	6.12 ± 3.23^a	5.63 ± 3.28^a	6.43 ± 5.37^a
ST	$\bar{X} \pm DS$	66.25 ± 7.97^a	49.18 ± 11.85^b	63.08 ± 11.81^a

Leyenda: N = 48. DS = Desviación estándar. $\bar{X}$ = Promedio. PR = Progresivos rápidos. C.V. = Coeficiente de variabilidad. SL= Solución de lavado. PM = Progresivos medios. PL = Progresivos lentos. ST = Estáticos. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Resultados similares y con la misma tendencia fueron reportados Montenegro (2022), los cuales fueron de 42.34%, 47.80% y 40.49% empelando los dilutores Triladyl®, OptiXcell® y AndroMed® respectivamente. Del mismo modo, Quishpe (2021), empleando el dilutor OptiXcell® obtuvo valores similares a los del presente estudio, los cuales fueron de 43.48% y 46.30%. Cabe mencionar,

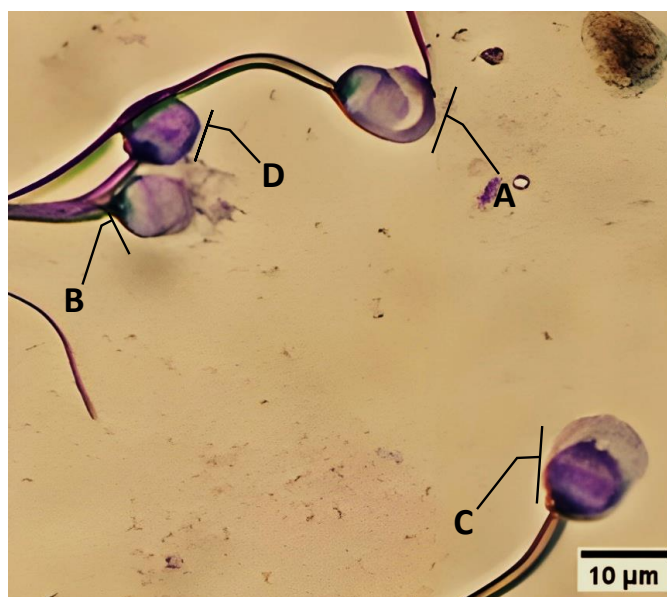
además, que los valores de motilidad encontrados fueron calculados usando programas informáticos logrando así resultados más objetivos.

Aragón (2019) y Cabeza *et al.* (2019), en muestras colectadas por electroeyaculación reportaron porcentajes superiores a los obtenidos en el presente estudio, los cuales fluctuaron entre un 60% y 75%, dicha diferencia entre los resultados obtenidos resultaría debido al método de colecta empleado, considerando que en muestras colectadas del epidídimo existe alta probabilidad de contaminación por restos de tejido y sangre lo cual afecta la viabilidad espermática (Guerrero, 2006), y además de ello los espermatozoides epididimarios se encuentran en inactividad metabólica por lo cual se tiene un mayor porcentaje de espermatozoides inmóviles (Guijarro, 2011).

Por otra parte, mediante una evaluación subjetiva de motilidad, Tapia y Tello (2016), Orrego (2022), Unchupaico *et al.* (2006), Benavides *et al.* (2020), Paredes *et al.* (2020), Llor (2015) y Mendoza y Huamani (2022) reportaron resultados variables los cuales van de entre un 30% a 90%. Esta heterogeneidad de resultados estaría asociada a la metodología empleada dentro de la evaluación de este parámetro. Debido a que una potencial fuente de variación en estos estudios es el observador, ya que su nivel de instrucción puede influir directamente en los resultados (Gómez, 2021).

7.1.4. VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL

Los resultados de los parámetros de espermatozoides vivos con acrosoma (ViCA), vivos sin acrosoma (ViSA), muertos con acrosoma (MuCA) y muertos sin acrosoma (MuSA) se presentan en la Tabla 8. Respecto a estas características no se observaron diferencias ($p>0.05$) entre las muestras procesadas con los tres dilutores usados en muestras espermáticas frescas.



Leyenda: (A) espermatozoides vivos con acrosoma intacto (ViCA). (B): espermatozoides vivos sin acrosoma (ViSA). (C): espermatozoides muertos con acrosoma (MuCA). (D): espermatozoides muertos sin acrosoma (MuSA).

Figura 3. Fotografía de la clasificación de vitalidad e integridad acrosomal en espermatozoides de cuy

Tabla 8. Vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas de cuy conservadas con tres dilutores durante un tiempo de exposición inicial (cero horas)

Parámetros	Dilutor			
		TRIS – yema + SL	OptiXcell® + SL	AndroMed® + SL
ViCA	$\bar{X} \pm DS$	44.99 $\pm$ 11.42 ^a	53.20 $\pm$ 11.26 ^a	50.17 $\pm$ 10.09 ^a
	C.V.	0.2538	0.2117	0.2011
	Max.	61.68	68.57	63.98
	Min.	20.00	29.58	27.78
ViSA	$\bar{X} \pm DS$	3.35 $\pm$ 2.20 ^a	2.77 $\pm$ 1.87 ^a	2.71 $\pm$ 1.85 ^a
MuCA	$\bar{X} \pm DS$	26.59 $\pm$ 3.95 ^a	24.85 $\pm$ 6.63 ^a	26.74 $\pm$ 6.19 ^a
MuSA	$\bar{X} \pm DS$	25.08 $\pm$ 8.96 ^a	19.19 $\pm$ 7.04 ^a	20.37 $\pm$ 7.50 ^a

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. $\bar{X}$ = Promedio. C.V. = Coeficiente de variabilidad. SL= Solución de lavado. ViCA = Vivos con acrosoma. ViSA = Vivos sin acrosoma. MuCA = Muertos con acrosoma. MuSA = Muertos sin acrosoma. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas (p<0.05).

No hay estudios previos que proporcionen datos sobre la vitalidad espermática e integridad acrosomal en cuyes. Sin embargo, hay reportes sobre la integridad acrosomal en esta especie, según Aragón (2019) utilizando como colorante el Coomassie Blue, obtuvo valores de integridad acrosomal del 96.57% en muestras colectadas por electroeyaculación, y de acuerdo con Quispe *et al.* (2021) los valores van de entre 72.97% a 87.9%, en muestras colectadas del epidídimo. Ambos estudios presentan resultados superiores a los del presente estudio, esta diferencia podría estar relacionada a los medios de dilución empleados y en mayor medida al protocolo empleado en dichas evaluaciones, en las cuales se utilizó el reactivo Coomassie Blue como colorante, mientras que en el presente estudio se optó por una tinción doble con los colorantes Trypan blue y Giemsa.

Se han observado reportes de estudios realizados en otras especies en las cuales se evaluó la vitalidad espermática e integridad acrosomal utilizando la misma metodología a la del presente estudio. En tal sentido, Bezerra *et al.* (2019), presentaron resultados de muestras espermáticas de conejos que mostraron una tendencia similar, con un 65.8% de espermatozoides vivos con acrosoma, 0.9% de espermatozoides vivos sin acrosoma, 15.1% de espermatozoides muertos con acrosoma y 11.3 % de espermatozoides muertos sin acrosoma. Así mismo, Santiani *et al.* (2005) reportaron un porcentaje de 78.3% de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en muestras espermáticas de alpacas.

7.2. CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE MUESTRAS REFRIGERADAS POR 24 HORAS DE CUYES

7.2.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

No hubieron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) respecto a la vitalidad espermática entre los dilutores evaluados luego de permanecer 24 horas de conservación en refrigeración a 5°C. Ello indica que la capacidad conservación de muestras en refrigeración por 24 horas es igual entre los tres dilutores, sin embargo, se mantuvo la superioridad porcentual del dilutor OptiXcell® + SL respecto de los dilutores AndroMed® + SL y TRIS - yema + SL (ver Tabla 9).

Tabla 9. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy conservadas 24 horas en refrigeración con tres dilutores

DILUTOR	Promedio $\pm$ DS	C.V.	Max.	Min.
TRIS – yema + SL	44.41 $\pm$ 9.88 ^a	0.2225	58.45	21.68
OptiXcell® + SL	51.51 $\pm$ 8.58 ^a	0.1665	59.51	29.50
AndroMed® + SL	45.56 $\pm$ 9.98 ^a	0.2191	58.45	22.64

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variabilidad.

SL= Solución de lavado. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Así mismo, Tapia y Tello (2016), en muestras refrigeradas por 24 horas, reportaron porcentajes que oscilaban entre un 20% y 30%, valores que resultaron ser inferiores a los obtenidos en el presente estudio, esta disparidad podría atribuirse a que los porcentajes de vitalidad inicial o en muestras frescas, los cuales eran igualmente más bajos y, además, podría estar relacionada con el tipo de dilutor empleado en cada caso.

7.2.2. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Los resultados de la prueba de funcionalidad de membrana plasmática de muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C se muestran en la Tabla 10, donde se encontró diferencias estadísticas significativas entre el dilutor OptiXcell® + SL respecto al dilutor Tris-yema + SL ($p < 0.05$). Así mismo, no se encontraron diferencias significativas entre los dilutores OptiXcell® + SL y AndroMed® + SL y del mismo modo el dilutor AndroMed® + SL y Tris-yema® + SL ($p > 0.05$).

Tabla 10. Funcionalidad de membrana de muestras espermáticas de cuy conservadas 24 horas en refrigeración con tres dilutores

DILUTOR	Promedio $\pm$ DS	C.V.	Max.	Min.
TRIS – yema + SL	17.16 $\pm$ 6.98 ^b	0.4068	29.85	7.50
OptiXcell® + SL	24.13 $\pm$ 7.33 ^a	0.3038	38.86	14.90
AndroMed® + SL	22.62 $\pm$ 8.61 ^{ab}	0.3806	42.15	12.50

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variabilidad.

SL= Solución de lavado. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Resultados similares en muestras refrigeradas por 24 horas, fueron reportados por Tapia y Tello (2016), los cuales fluctuaron entre 15% y 23%, esta similitud podría deberse a que en ambos estudios se empleó la misma metodología en la evaluación de este parámetro.

7.2.3. MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Los resultados de motilidad total, espermatozoides progresivos rápidos (PR), medios (PM), lentos (PL) y estáticos (ST) se muestran en la Tabla 11. En cuanto a la motilidad total, espermatozoides PR y ST, se observaron diferencias entre las muestras procesadas con los dilutores TRIS – yema + SL y AndroMed® + SL, en comparación con las muestras diluidas con OptiXcell® + SL ($p < 0.01$), que mostró una mejor capacidad de conservación de muestras espermáticas en refrigeración. Asimismo, se encontraron diferencias en el porcentaje de espermatozoides PL entre los dilutores AndroMed® + SL y OptiXcell® + SL respecto al dilutor TRIS – yema + SL ($p < 0.05$). En cuanto al porcentaje de espermatozoides PM, no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los tres dilutores evaluados.

Tabla 11. Motilidad de muestras espermáticas de cuy conservadas en refrigeración por 24 horas con tres dilutores

Parámetros		Dilutor		
		TRIS – yema + SL	OptiXcell® + SL	AndroMed® + SL
Motilidad total	$\bar{X} \pm DS$	26.95 $\pm$ 7.79 ^b	41.26 $\pm$ 8.15 ^a	29.03 $\pm$ 7.56 ^b
	C.V.	0.2891	0.1975	0.2604
	Max.	45.25	61.34	44.65
	Min.	8.80	27.13	9.95
PR	$\bar{X} \pm DS$	15.46 $\pm$ 5.85 ^b	26.2 $\pm$ 7.61 ^a	14.76 $\pm$ 6.87 ^b
PM	$\bar{X} \pm DS$	6.33 $\pm$ 2.63 ^a	7.38 $\pm$ 2.55 ^a	6.08 $\pm$ 2.26 ^a
PL	$\bar{X} \pm DS$	5.15 $\pm$ 2.72 ^b	7.64 $\pm$ 4.26 ^a	8.18 $\pm$ 5.63 ^a
ST	$\bar{X} \pm DS$	73.05 $\pm$ 7.79 ^a	58.74 $\pm$ 8.15 ^b	70.97 $\pm$ 7.56 ^a

Leyenda: N = 48. DS = Desviación estándar. $\bar{X}$ = Promedio. PR = Progresivos rápidos. C.V. = Coeficiente de variabilidad. SL= Solución de lavado. PM = Progresivos medios. PL = Progresivos lentos. ST = Estáticos. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas (p<0.05).

En muestras refrigeradas por 24 horas, Montenegro (2022), reportó resultados de motilidad con una tendencia similar los cuales fueron de 27.58, 36.5 y 32.3% usando los dilutores Triladyl®, OptiXcell® y AndroMed® respectivamente. Esta similitud podría atribuirse a que las muestras se obtuvieron mediante el mismo método, se emplearon los mismos dilutores y se utilizó un software computarizado para evaluar este parámetro en ambos casos.

Así mismo, Tapia y Tello (2016) reportaron porcentajes inferiores los cuales fueron comprendidos entre 7.8% y 29%. Por otro lado, Gonzales y Gonzales (2008) obtuvieron porcentajes de entre 50% y 60%, siendo estos superiores a los obtenidos en el presente estudio. Estas discrepancias se deberían a variaciones iniciales en los promedios de motilidad de las muestras frescas en ambos estudios, así como el uso de diferentes medios en la dilución. Pero en ambos casos y respecto al presente estudio, dichas discrepancias se deberían en mayor proporción a que la evaluación de motilidad se llevó a cabo mediante una observación directa, introduciendo así un componente subjetivo y por ende variabilidad a los resultados.

7.2.4. VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL

Los resultados de los parámetros de espermatozoides ViCA, ViSA, MuCA y MuSA se detallan en la Tabla 12. Se observa una disminución en la proporción de los espermatozoides ViCA refrigerados respecto a las muestras frescas con los tres dilutores empleados. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en cada uno de los parámetros evaluados entre los tres dilutores empleados en muestras espermáticas refrigeradas durante 24 horas.

Tabla 12. Vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas de cuy conservadas en refrigeración por 24 horas con tres dilutores

Parámetros	Dilutor			
		TRIS – yema + SL	OptiXcell® + SL	AndroMed® + SL
ViCA	$\bar{X} \pm DS$	35.53 ± 12.11^a	46.65 ± 10.23^a	43.30 ± 10.41^a
	C.V.	0.3408	0.2193	0.2404
	Max.	52.75	61.88	54.95
	Min.	17.39	25.68	24.77
ViSA	$\bar{X} \pm DS$	2.48 ± 1.55^a	2.93 ± 1.38^a	2.47 ± 1.53^a
MuCA	$\bar{X} \pm DS$	28.53 ± 7.68^a	25.37 ± 4.51^a	28.21 ± 4.32^a
MuSA	$\bar{X} \pm DS$	33.45 ± 15.46^a	25.05 ± 7.20^a	26.02 ± 8.40^a

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. $\bar{X}$ = Promedio. C.V. = Coeficiente de variabilidad. SL: Solución de lavado. ViCA = Vivos con acrosoma. ViSA = Vivos sin acrosoma. MuCA = Muertos con acrosoma. MuSA = Muertos sin acrosoma. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($p<0.05$).

No se encontraron estudios previos que proporcionen datos acerca del efecto del tiempo de refrigeración sobre la vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas de cuyes. No obstante, hay reportes de estudios en otras especies, como es el caso de Manosalva *et al.* (2005), quienes reportaron una reducción de entre 25% y 28% de la integridad acrosomal por efecto de la refrigeración en muestras de espermatozoides caninos. Esto se debería a que la refrigeración provoca una desestabilización en las muestras espermáticas a nivel de la membrana, activando los canales de calcio y permitiendo un influjo masivo de iones de calcio al medio intracelular. Este fenómeno induce la fusión de la

membrana acrosomal y la liberación del contenido acrosomal (Tartaglione y Ritta, 2004).

7.3. CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DE MUESTRAS CRIOPRESERVADAS DE CUYES

7.3.1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

Los resultados de la vitalidad espermática de muestras espermatozoides de cuy procesadas con los tres dilutores evaluados luego del proceso de criopreservación se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 13. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy criopreservadas con tres dilutores

DILUTOR	Promedio $\pm$ DS	C.V.	Max.	Min.
TRIS – yema + SL	3.57 $\pm$ 2.27 ^a	0.6359	10.00	1.29
OptiXcell® + SL	1.54 $\pm$ 1.40 ^b	0.9091	3.67	0.00
AndroMed® + SL	1.65 $\pm$ 1.34 ^b	0.8121	5.34	0.00

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variabilidad.

SL= Solución de lavado. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Se encontraron diferencias ($p < 0.05$) al comparar los dilutores AndroMed® + SL y OptiXcell® + SL con el dilutor TRIS – yema + SL, demostrando que el uso del dilutor TRIS – yema + SL fue levemente superior (3.57%). Sin embargo, en general los valores de vitalidad empleando los tres dilutores fueron mínimos. Según Rodríguez *et al.* (2008), una muestra espermática criopreservada debe contener entre un 45% y 50% de espermatozoides intactos para ser empleados en fertilizaciones *in vitro* e inseminaciones artificiales. Esto hace que todas las muestras espermáticas criopreservadas y procesadas con los tres dilutores sean descartables.

Quishpe (2021) y de manera similar, Mendoza y Huamani (2022) reportaron porcentajes superiores en sus respectivos estudios. Quishpe registró porcentajes de 15.08% y 14.42%, mientras que Mendoza y Huamani registraron

porcentajes de 20.3%,14.7% y 5.7%. Estas diferencias sustanciales, podrían atribuirse al uso de diferentes crioprotectores y a la aplicación de distintos protocolos y curvas de congelación de muestras espermáticas en dichos estudios. En particular, se llevaron a cabo mediante un proceso de congelación inicial en vapor de nitrógeno de manera gradual con una rampa de 15 minutos a más, mientras que en el presente estudio ese tiempo se ajustó a 7 minutos. Por otro lado, Tapia y Tello (2016), obtuvieron resultados nulos respecto a este parámetro, lo cual podría deberse al dilutor empleado, al protocolo de congelación en el cual no se redujo la temperatura gradualmente y a que sus valores iniciales de vitalidad fueron menores al 50%.

Estas aseveraciones podrían ser corroboradas por Váradi *et al.* (2013) quienes señalan que una congelación de programación lenta otorga mejores resultados en comparación con una congelación de programación rápida, sin embargo, se tiene una mayor proporción de anormalidades empleando una congelación lenta.

Por otro lado, Mise (2014), reportó porcentajes de 70% de vitalidad en muestras descongeladas, cifra que resulta notablemente superior a las obtenidas en el presente estudio y a las descritas anteriormente. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados se deberían en mayor medida por aspectos subjetivos (propios del observador), ya que en dicho estudio no se proporciona de manera detallada la metodología empleada en cada caso, lo que implicaría una falta de confiabilidad y representatividad de los datos obtenidos en dicho estudio (Gómez, 2021).

7.3.2. FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA PLASMÁTICA

Respecto a la prueba de funcionalidad de membrana plasmática se obtuvieron valores de 1.8% para TRIS – yema + SL, 2.26% para OptiXcell® + SL y 1.25% para AndroMed® + SL, siendo estos valores estadísticamente no significativos ($p>0.05$) (ver Tabla 14).

Mendoza y Huamani (2022), obtuvieron porcentajes más elevados, los cuales fueron de 17.6%, 8.2% y 2.6%, al emplear diferentes crioprotectores. Estas diferencias podrían atribuirse en gran medida al protocolo de congelación

empleado en dicho estudio siendo este más prolongado a comparación del presente estudio.

Tabla 14. Funcionalidad de membrana de muestras espermáticas de cuy criopreservadas con tres dilutores

DILUTOR	Promedio $\pm$ DS	C.V.	Max.	Min.
TRIS – yema + SL	1.80 $\pm$ 1.75 ^a	0.9722	7.56	0.00
OptiXcell® + SL	2.26 $\pm$ 1.86 ^a	0.8230	7.91	0.44
AndroMed® + SL	1.25 $\pm$ 0.90 ^a	0.72	3.37	0.00

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. C.V. = Coeficiente de variabilidad.

SL= Solución de lavado. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

No obstante, Tapia y Tello (2016) obtuvieron un 0% de espermatozoides sin reacción a la prueba de funcionalidad de membrana, Estos resultados nulos podrían deberse al tipo de dilutor empleado, a la congelación que no se realizó de manera gradual según su protocolo, y a que sus valores iniciales para este parámetro no superaban el 20%.

7.3.3. MOTILIDAD ESPERMÁTICA

La motilidad espermática de las muestras criopreservadas y procesadas con los tres dilutores, no fueron diferentes ($p > 0.05$), y como se muestra en la Tabla 15, no superan el 1%.

En contraste, Quishpe (2021) reportó porcentajes de motilidad del 15.08% y 14.42% en muestras espermáticas criopreservadas de cuy. Estos resultados superiores a los del presente estudio, podrían surgir debido a que en dicho estudio se empleó una curva de congelación lenta, reduciendo la temperatura de manera gradual, lo que probablemente influyó positivamente en la preservación de la motilidad espermática (Váradi *et al.* 2013).

Tabla 15. Motilidad de muestras espermáticas criopreservadas con tres dilutores

Parámetros		Dilutor		
		TRIS – yema + SL	OptiXcell® + SL	AndroMed® + SL
Motilidad total	$\bar{X} \pm DS$	0.08 ± 0.34^a	0.22 ± 0.58^a	0.34 ± 1.01^a
	C.V.	4.25	2.6363	2.9706
	Max.	1.72	2.84	4.96
	Min.	0.00	0.00	0.00
PR	$\bar{X} \pm DS$	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a
PM	$\bar{X} \pm DS$	0.01 ± 0.08^a	0.03 ± 0.17^a	0.00 ± 0.00^a
PL	$\bar{X} \pm DS$	0.04 ± 0.17^a	0.10 ± 0.29^a	0.09 ± 0.25^a
ST	$\bar{X} \pm DS$	99.95 ± 0.19^a	99.87 ± 0.33^a	99.92 ± 0.24^a

Leyenda: N = 48. DS = Desviación estándar. $\bar{X}$ = Promedio. PR = Progresivos rápidos. C.V. = Coeficiente de variabilidad. SL= Solución de lavado. PM = Progresivos medios. PL = Progresivos lentos. ST = Estáticos. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Por otro lado, Tapia y Tello (2016), obtuvieron resultados nulos, Mendoza y Huamani (2022), obtuvieron porcentajes de 18.8%, 11.7% y 3.3% y por último Mise (2014), obtuvo una motilidad espermática de 61% en muestras espermáticas criopreservadas de cuyes, siendo esta notablemente superior respecto al presente estudio y a los anteriormente mencionados. Estas variaciones en los porcentajes de motilidad podrían atribuirse a los diferentes protocolos de congelación empleados y principalmente a la metodología empleada en la evaluación de este parámetro. En los estudios mencionados, la motilidad se evaluó por observación directa o manual, lo que conlleva cierto grado de subjetividad en comparación con metodologías que utilizan Softwares. Esto puede dar lugar a resultados poco representativos (Gómez, 2021).

7.3.4. VITALIDAD E INTEGRIDAD ACROSOMAL

Los resultados de espermatozoides ViCA, ViSA, MuCA y MuSA se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 16. Vitalidad e integridad acrosomal muestras espermáticas criopreservadas con tres dilutores

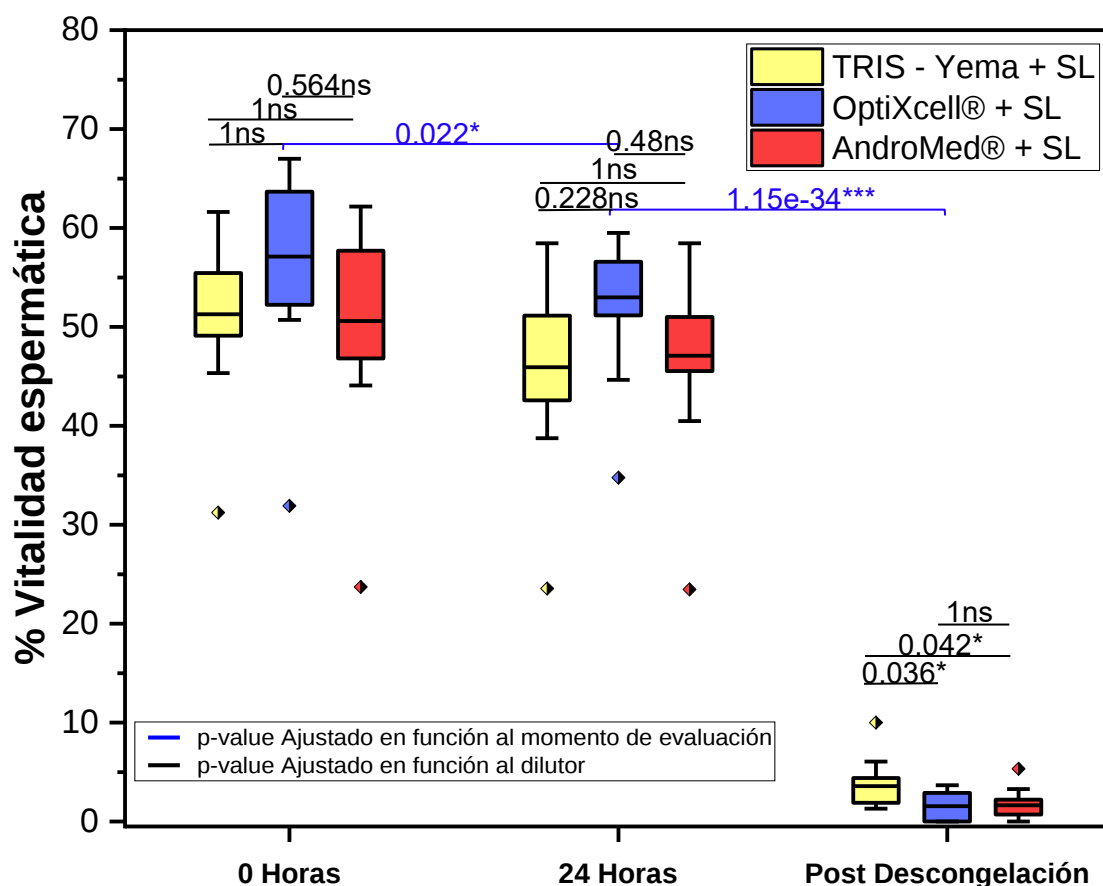
Parámetros	Dilutor			
		TRIS – yema + SL	OptiXcell® + SL	AndroMed® + SL
ViCA	$\bar{X} \pm DS$	0.45 ± 0.78^a	1.05 ± 1.64^a	0.33 ± 0.72^a
	C.V.	0.3408	0.2193	0.2404
	Max.	0.97	5.24	11.00
	Min.	0.00	0.00	0.00
ViSA	$\bar{X} \pm DS$	1.89 ± 1.33^a	2.03 ± 1.38^a	1.50 ± 0.77^a
MuCA	$\bar{X} \pm DS$	2.07 ± 1.58^a	2.21 ± 1.74^a	1.52 ± 1.58^a
MuSA	$\bar{X} \pm DS$	95.60 ± 1.85^{ab}	94.71 ± 2.03^b	96.66 ± 1.75^a

Leyenda: N = 16. DS = Desviación estándar. $\bar{X}$ = Promedio. C.V. = Coeficiente de variabilidad. SL= Solución de lavado. ViCA = Vivos con acrosoma. ViSA = Vivos sin acrosoma. MuCA = Muertos con acrosoma. MuSA = Muertos sin acrosoma. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Se observa diferencia ($p < 0.05$) en los espermatozoides MuCA entre los dilutores OptiXcell® + SL y AndroMed® + SL, pero no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los parámetros de espermatozoides ViCA, ViSA y MuCA entre los tres dilutores empleados en muestras espermáticas post descongelación. No obstante, no existen estudios previos que proporcionen datos acerca de la vitalidad espermática e integridad acrosomal de muestras espermáticas criopreservadas en cuyes, lo que limita la realización de comparaciones. Aunque es evidente que el proceso de criopreservación afectó negativamente a las muestras espermáticas de cuy, es posible que los crioprotectores contenidos en los dilutores no hayan evitado la formación de cristales al interior de las membranas celulares y por ello se hayan generado daño de las mismas.

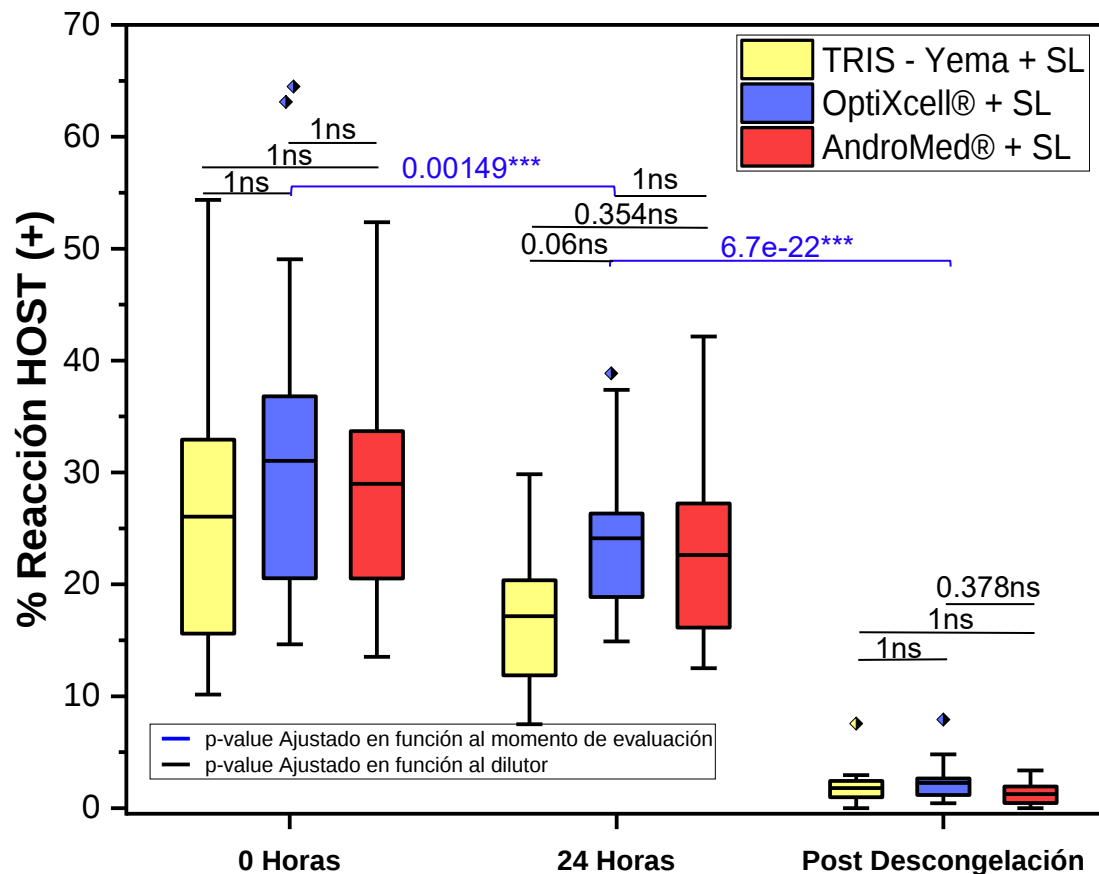
7.4.EFECTO DE LOS PROCEDIMIENTOS DE REFRIGERACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE MUESTRAS ESPERMÁTICAS DE CUYES

Considerando los procedimientos de conservación (momento de evaluación) en cada uno de los parámetros evaluados, se observó una clara diferencia entre muestras frescas y refrigeradas por 24 horas, y del mismo en las muestras criopreservadas ($p < 0.01$), tal como se aprecia en las Figuras 4, 5 y 6 que se muestran a continuación:



Leyenda: ns = no significativo; *** = $p < 0.001$

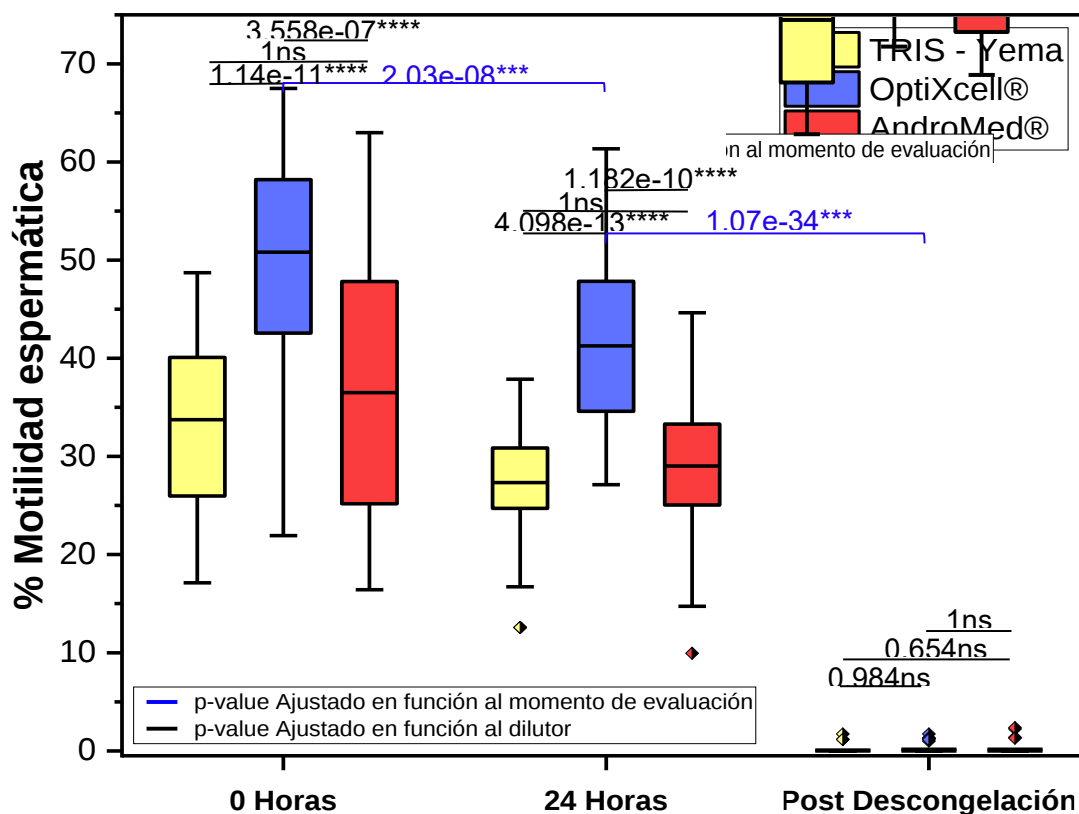
Figura 4. Vitalidad de muestras espermáticas de cuy en función al momento de evaluación con tres dilutores



Leyenda: ns = no significativo; *** = $p < 0.001$

Figura 5. Funcionalidad de membrana (HOST Test) de muestras espermáticas de cuy en función al momento de evaluación con tres dilutores

Se observó una superioridad significativa en el parámetro de motilidad espermática, así como en los parámetros de vitalidad espermática, funcionalidad de membrana plasmática y vitalidad espermática e integridad acrosomal para las muestras diluidas con el dilutor OptiXcell® + SL tanto en las muestras frescas como en las refrigeradas por 24 horas.



Leyenda: ns = no significativo; *** = $p < 0.001$

Figura 6. Motilidad de muestras espermáticas de cuy en función al momento de evaluación con tres dilutores

Esto se debería a que el dilutor OptiXcell®, en comparación con los dilutores AndroMed® y TRIS – yema, tiene liposomas o vesículas de fosfolípidos en su composición. Estos componentes presentan lípidos que desempeñan un papel crucial al proteger la membrana plasmática de los espermatozoides y además estos son capaces de adherirse fácilmente a la membrana citoplasmática de los espermatozoides, lo cual a su vez permite aprovechar al máximo los nutrientes del medio logrando así una mejor adaptación a situaciones de estrés térmico y oxidativo (IMV Technologies, s. f.). Así mismo, el dilutor AndroMed®, al igual que el dilutor OptiXcell® están exentos de proteínas de origen animal. No obstante, el dilutor AndroMed® en particular contiene lecitinas provenientes de la soya las cuales contribuyen únicamente a proteger la membrana plasmática de los espermatozoides (Minitube international, s. f.).

Por otro lado, el dilutor TRIS – yema ha demostrado buenos resultados en muestras frescas y criopreservadas en diversas especies. A pesar de esto, al ser

una proteína de origen animal o biológica, presenta un riesgo potencial de contaminación bacteriana, lo cual se convierte en un factor limitante en la conservación en refrigeración de muestras espermáticas por largos periodos de tiempo debido a que esto afecta negativamente la viabilidad espermática, lo que podría explicar la inferioridad en los resultados obtenidos (Ahmad *et al.*, 2008).

No obstante, en los resultados de las muestras descongeladas se evidenció una disminución significativa en cada uno de los parámetros de viabilidad evaluados empleando los tres dilutores, pese a que estos incorporaban crioprotectores dentro de su composición. Estos resultados con valores ínfimos podrían deberse a las características de cada uno de los dilutores, ya que los dilutores comerciales empleados fueron elaborados y diseñados originalmente para otras especies animales.

Así mismo, la notable disminución en todos los parámetros evaluados en las muestras criopreservadas de cuyes podrían estar vinculadas específicamente al protocolo de congelación empleado, a la morfometría y fisiología de los espermatozoides del cuy. Cabe señalar que Allende y Arisnabarreta (2021), sugieren que la aplicación de un proceso de congelación rápido resulta en un mayor daño celular, específicamente en las membranas plasmáticas, ocasionando desprendimientos de acrosomas debido a la formación de cristales intracelulares. Estos cristales se generan cuando se limita la salida del agua intracelular hacia el medio extracelular por un factor de tiempo. Así mismo, dicha formación de cristales aumenta en proporción al tamaño y al área de la cabeza del espermatozoide, debido a que a mayor tamaño celular mayor contenido de agua (López *et al.*, 2012). En este contexto, los espermatozoides del cuy presentan un tamaño y área de la cabeza morfométricamente mayor en comparación con otras especies (Cabeza, 2019; Ormachea *et al.*, 2019; Teves y Roldan, 2022), lo cual hace a los espermatozoides de cuy ser más susceptibles al proceso de criopreservación.

En general la refrigeración y criopreservación tienen un efecto directo sobre las características microscópicas de las muestras espermáticas, ocasionando alteraciones en la membrana plasmática como hinchazón y disrupción, cambios en la fluidez, alteraciones en el flujo de calcio y cambios enzimáticos los cuales

provocarían bajas en la viabilidad espermática y así mismo un desprendimiento o reacción de la membrana acrosómica y plasmática de los espermatozoides (Manosalva *et al.*, 2005; Tartaglione y Ritta, 2004; Rubio *et al.*, 2009). Por lo que estas circunstancias explicarían los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados, y del mismo modo el notable aumento en la proporción de espermatozoides muertos sin acrosoma (MuSA).

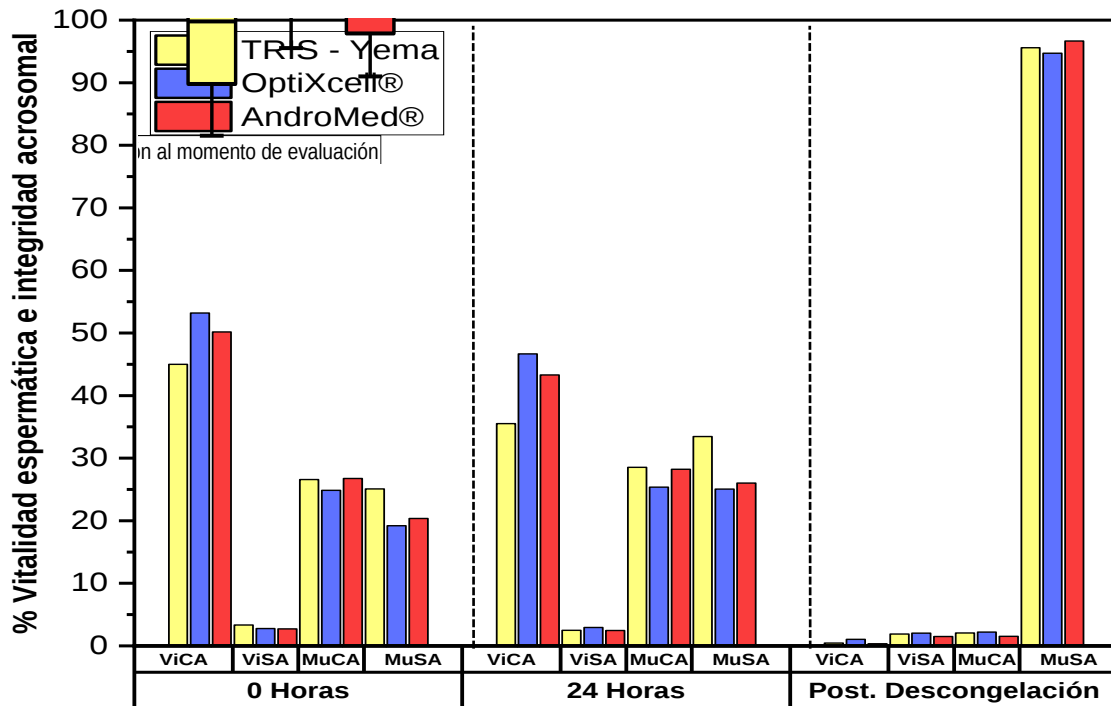


Figura 7. Vitalidad e integridad acrosomal de muestras espermáticas en función al momento de evaluación con tres dilutores

VIII. CONCLUSIONES

Como producto de la presente investigación, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- En las muestras espermáticas de cuy, en un tiempo de exposición inicial a los dilutores evaluados, no se observaron diferencias en las características microscópicas. Sin embargo, el dilutor OptiXcell® el cual demostró ser superior frente a los otros dos dilutores en el parámetro de motilidad espermática ($p < 0.05$).
- Luego de 24 horas de refrigeración a 5°C se observó que las muestras espermáticas de cuy diluidas con OptiXcell® mostraron mayor motilidad (41.26%) y funcionalidad de membrana ($p < 0.05$). No obstante, en el resto parámetros evaluados, no se observaron diferencias significativas.
- En el análisis de las muestras espermáticas de cuyes criopreservadas, se observó que las muestras diluidas con el dilutor TRIS – Yema, mostraron una vitalidad superior (3.57%) respecto de los otros dos dilutores. Sin embargo, en los otros parámetros evaluados, no se registraron diferencias significativas.
- La conservación en refrigeración a 5°C por 24 horas y la criopreservación, tuvieron un impacto significativo en la reducción de parámetros evaluados en las muestras espermáticas de cuy. Así mismo, las muestras criopreservadas se mostraron en general valores mínimos, independientemente del dilutor empleado en cada una de más muestras evaluadas, lo cual hace inviables dichas muestras para su aplicación en las diversas biotecnologías reproductivas disponibles en la actualidad.

IX. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la evaluación de las muestras espermáticas de inmediato después de su recolección para minimizar el deterioro de las mismas.
- Al observar el deterioro de la calidad general de las muestras espermáticas de cuy, por efecto de la refrigeración durante 24 horas, se recomienda realizar la criopreservación de muestras luego de dos o cuatro horas de equilibrar en refrigeración las muestras con los dilutores.
- Se recomienda evaluar las muestras refrigeradas por un lapso de tiempo mayor para determinar el cambio gradual que se da en función al tiempo de conservación en refrigeración.
- Se recomienda evaluar el uso de protocolos con diferentes curvas de congelación lenta para determinar si de esta manera se reduce el daño a las muestras espermáticas.
- Realizar investigaciones con otros dilutores comerciales y crioprotectores para evaluar su efecto sobre la calidad de muestras espermáticas criopreservadas.
- Evaluar el efecto de diferentes medios hipotónicos e hipertónicos para reducir la formación de cristales intracelulares por efecto de la criopreservación, lo cual podría tener un impacto positivo en la conservación de la calidad de los espermatozoides de cuy.

X.BIBLIOGRAFÍA

Agüera, E.; Agüera, S.; Alcalde, A.I.; Almar, M.; Álvarez, A. I.; Colaço, A. A. (2018). Fisiología Veterinaria. Editorial Tébar Flores, S.L.. Madrid, España. pp: 949-960.

Ahmad, M. Z.; Chatagnon, G.; Amirat, L.; Moussa, M.; Tainturier, D.; Anton, M.; Fieni, F. (2008). Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(4): 429-436. DOI:10.1111/j.1439-0531.2007.00930.x

Allende, R.; Arisnabarreta, E. (2021). Fisiología espermática, producción de semen y evaluación de la calidad seminal.

Aragón, S. (2019). Características macroscópicas, microscópicas, estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de cuy (*Cavia porcellus*). [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. Cusco. Perú. pp:17-72.

Ávalos, A.; Vargas, A. K.; González, J. A.; Herrera, J. A. (2018). Recolección y manipulación seminal *in vitro*.. Universidad Autónoma Metropolitana. México. pp: 14-41.

Ávila, L. M.; Madero, J. I.; Claudia López, M. F.; Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L. G.; Gómez, C. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. 57(4): 291-300.

Ayala, L. E.; Rodas, R.; Almeida, A.; Torres, C. S.; Nieto, P. E. (2017). Espículas peneanas del cobayo (*Cavia porcellus*), influencia sobre el comportamiento sexual, fertilidad y calidad espermática. *Revista de producción animal*. 29(3): 36-42.

Batista, M.; Santana, M.; Álamo, D.; Cabrera, F.; González, F.; Gracia, A. (2013). Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales? *Revista Canaria de las Ciencias Veterinarias*: 29-34.

- Benavides, F.; Sutovsky, P.; López, V.; Kennedy, C.; Echevarría, L. (2020). Semen Parameters of Fertile Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) Collected by Transrectal Electroejaculation. *Animals*. 10(5): 767. DOI:10.3390/ani10050767
- Bezerra, M.; Arruda, J.; Martins, J.; Viana, A.; Viana, A.; Rego, J.; Moura, A. (2019). Major seminal plasma proteome of rabbits and associations with sperm quality. *Theriogenology*. 128: 156-166. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.01.013
- Bled, L.; Rios, G.; Faverin, C.; Alberio, R.; Aller, J.; Hozbor, F. (2007). Optimización de una prueba hipoosmótica para la evaluación de semen fresco y refrigerado de conejo. *Revista Argentina de Producción Animal*. 27(1): 258-259.
- Breazile, J. E.; Brown, E. M. (1976). *The Biology of Guinea Pig*. 1 ed. J. E. Wagner; P. J. Manning, Edits. Academic press. New York, San Francisco London. pp: 53-92. DOI:10.1016/b978-0-12-730050-4.50011-9
- Buchelly, F.; Zalazar, L.; Pastore I.; Greco B.; Iniesta M.; Garde J.; Soler J.; Ballarin V.; Cesari A. (2018). Evaluación objetiva de la motilidad de los espermatozoides de carneros y machos cabríos mediante el uso de un novedoso software de seguimiento de espermatozoides. *Reproducción*. 156(1):11-21. DOI: 10.1530/REP-17-0755.
- Cabeza, U. (2019). Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*) colectado por electroeyaculación. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco].., Cusco, Perú. pp: 6-69.
- Cabeza, U.; Ordóñez, C.; Meza, A.; Cucho, H. (2020). Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide del cuy (*Cavia porcellus*). *Spermova*. 10(2): 94-101. DOI:10.18548/aspe/0008.14
- Cabrera, P.; Ayulo, A.; Pantoja, C. (2011). Efecto del dilutor TRIS y Citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*. 22(2): 105-113. DOI:10.15381/rivep.v22i2.276

- Cabrita, E.; Alvarez, R.; Anel, L.; Rana, K. J.; Herraiez, M. P. (1998). Sublethal Damage during Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. *Cryobiology*. 37(3): 245-253. DOI:10.1006/cryo.1998.2121
- Castro, H. P. (2002). Sistemas de Crianza de Cuyes a Nivel Familiar-Comercial en el Sector Rural. Provo, Utah, USA. Recuperado el 18 de 07 de 2022
- Castro, M.; Orrego, F.; Cecenardo, M.; Chauca, L.; Alvarado, E. (2019). Desarrollo de un maniquí y vagina artificial para colección de semen en cuyes (*Cavia Porcellus*). XLII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal APPA 2019. Tingo María, Perú.
- Chauca, L. (1997). Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Estudios FAO: Producción y sanidad animal - Spanish Edition. La Molina, Perú. pp: 1-30.
- Cruz, C. F.; Tiparra, J. I. (2018). Efecto de Diferentes Dilutores en la Inseminación Artificial en Reproducción de Conejos Criollos. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo]. Lambayeque. Perú. pp: 2-41.
- Cuenca, M.; Avellaneda, J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 18(9): 1-11.
- Didion, B. A.; Dobrinsky, J. R.; Giles, J. R.; Graves, C. N. (1989). Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*. 22(1): 51-57. DOI:10.1002/mrd.1120220106
- Enciso, A. J. (1986). La importancia del cuy: un estudio preliminar. Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. pp: 8-45.
- Ferreira, J. (1993). El agua de coco como dilutor del semen caprino. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*. 3(3): 269-272.
- Flores, L. M.; Moscoso, J. E.; Camero, J.; Angulo-Tisoc, J.; Jeri, J.; solar, J. M. (2018). Momento óptimo de sacrificio comercial de cuyes (*Cavia porcellus*) criados bajo distintos sistemas de alimentación. *Compendio de Ciencias Veterinarias*. 8(1): 07-15. DOI:10.18004/compend.cienc.vet.2018.08.01.07-15
- Fox, J. G.; Anderson, L. C.; Otto, G. M.; Pritchett, K. R.; Whary, M. T. (2015). *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press. pp: 247-283.

Frandsen, R. (1988). Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Editorial Ileramericana.

Freund, M. (1969). Interrelationships among the characteristics of guinea-pig semen collected by electro-ejaculation. *Reproduction*. 19(3): 393-403. DOI:10.1530/jrf.0.0190393

Fumuso, F. G.; Gimenez, M. L.; Neild, D. M.; Giuliano, S. M.; Chaves, M. G.; Carretero, M. I. (2014). Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova*. 4(1): 50-53.

Gadea, J. (2003). Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2): 17-27.

Gandarillas, D.; Quispe, A. E. (2021). Terminología en Biotecnología Reproductiva Animal. Editorial U. N. Grohmann. Tacna, Perú. pp: 10-26.

García, R. (2000). Efecto de los inhibidores de H⁺-ATPasa durante la maduración, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide de conejo. [Tesis de Postgrado, Universidad Autónoma Metropolitana]. Ciudad de México. México. pp: 1-62.

Giraldo, J. J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*. 4(1): 51-57.

Gómez, E. (2021). Errores frecuentes en la investigación biomédica: sesgos, confusión e interacción. En *Epidemiología en investigación para la salud*. Editorial Médica Panamericana. pp:1-17.

Gonzales, H. (1988). Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epididimo. [Tesis de Postgrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Lima. Perú. pp:140.

González, H.; González, H. M. (2005). Biotecnología reproductiva: Una alternativa para mejorar la producción animal. *Biotempo*: 5-11.

Gonzales, H.; Gonzales, H. M. (2008). Capacidad fecundante de espermatozoides epididimarios de (*Cavia porcellus*) "cuy" mantenidos en estrés hipotérmico. *Biotempo*: 15-21. DOI:10.31381/biotempo.v8i0.858

Guerrero, C. A. (2006). Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa.[Tesis de postgrado, Louisiana State University].Louisiana. USA. pp: 30-169.

Guijarro, R. A. (2011). Influencia del tiempo de almacenamiento postmortem del epididimo, del medio de dilución y de la técnica de selección espermática en fecundación *in vitro*, en la calidad del semen de toro de lidia. [Tesis Postgrado, Universidad de León]. León. España. pp: 31-169.

Hafez, E. S.; Hafez, B. (2002). Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. pp: 3-199.

Hargaden, M.; Singer, L. (2012). The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents (American College of Laboratory Animal Medicine ed.). (M. A. Suckow, K. A. Stevens, R. P. Wilson, Edits.) Academic Press. pp: 575-602. DOI:10.1016/B978-0-12-380920-9.00020-1.

Hishinuma, M.; Suzuki, K.; Sekine, J. (2003). Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees C. Theriogenology. 59(3-4): 813-820. DOI:10.1016/S0093-691X(02)01154-8

Iglesias, A.; Guevara, J.; López, O.; Guerra, J.; Huerta, R.; Sánchez, R.; Córdova, A. (2019). Evaluación de la técnica modificada de tinción Giemsa en la valoración acrosomal de espermatozoides de mamíferos. Abanico Veterinario. 9: 1-8. DOI:10.21929/abavet2019.927

IMV Technologies. (s. f.). OptiXcell Semen Extender. Recuperado de <https://www.imv-technologies.com/>

INIA. (9 de Octubre de 2020). Recuperado el 10 de Octubre de 2022, de <https://www.inia.gob.pe/2020-nota-105/>

Jeyendran, R. S.; Van der Ven, H. H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B. G.; Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Reproduction. 70(1): 219–228. DOI:10.1530/jrf.0.0700219

Kandelousi, M. S.; Arshami, J.; Naserian, A.; Abavisani, A. (2013). The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. Open veterinary journal: 47-52.

Khalil, W. A.; El-Harairy, M. A.; Zeidan, A. E.; Hassan, M. A.; Mohey-Elsaeed, O. (2017). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. International Journal of Veterinary Science and Medicine: 1-8. DOI:10.1016/j.ijvsm.2017.11.001

Lombardi, C. (2018). Espermogramas: ¿Por qué hay que tener entre 2 y 5 días de abstinencia sexual?. Reprotec. Buenos Aires. Argentina. pp: 1-3.

Loor, A. I. (2015). Caracterización morfológica del espermatozoide del cobayo (*Cavia porcellus*) en el cantón Latacunga. [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Latacunga. Ecuador. pp:18-53.

López, J.; Urbano, A.; Cárdenas, M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. OmniaScience. DOI:10.3926/oss.5

Manosalva, I.; Cortés, C.; Leyva, V.; Valdivia, M.; Reyes, M. D.; Barros, C.; Moreno, R. (2005). Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de la membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 16(2): 114-128.

Marcantonio, S. A. (2021). Biotecnologías de la reproducción aplicadas al bovino. Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina.

Márquez, N.; Valencia, R.; Chauca, L.; Verde, G. (2019). Estudio anatómico del glándula del cuy (*Cavia porcellus*) de la raza Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 30(3): 995-1002. DOI:10.15381/rivep.v30i3.16722

Martan, J.; Shepherd, B. A. (1976). The role of the copulatory plug in reproduction of the guinea pig. Journal of Experimental Zoology. 196(1): 79-83. DOI:10.1002/jez.1401960108

Mega, E.; Umi, L. (2021). Anatomy and Histology of Reproductive Organ of Male Guinea Pig As a Source of Learning. Proceeding International Conference on Science and Engineering. 1: 9-18.

Mendoza, J. L.; Huamani, J. E. (2022). Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (*Cavia porcellus*). [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Huancavelica]. Huancavelica. Perú. pp: 20-52.

Milán, W. A.; Zaldivar, Q. N.; Vidal, E. D.; Campos, A. M.; Gonzáles, R. (2013). Morfometría y eyaculado en relación con el diagnóstico precoz de fibrosis testicular en sementales porcinos. Revista Veterinaria Argentina. 30(307): 1-26.

Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2012). Producción de Cuyes. Lima.

Minitube International. (s. f.). Product Datasheet: AndroMed Semen Extender. Recuperado de <https://www.minitube.com/>

Mise, M. N. (2014). Evaluación de la crioconservación del semen de Cobayo (*Cavia Porcellus*). [Tesis de Pregrado, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Latacunga. Ecuador. pp: 27-36.

Montenegro, A. C. (2022). Evaluación de tres crioprotectores para la crioconservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) extraído de la cola del epidídimo en el Centro Experimental Uyumbicho. [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador] Quito. Ecuador. pp: 22-34.

Morales, L. M.; Vega, H. (1983). Líquido seminal (Importancia de la fructuosa en líquido seminal). Revista Médica de Costa Rica: 27-30.

Ormachea, E.; Calsin, B.; Zegarra, E. (2019). Cinética y morfometría espermática en semen congelado sexado y convencional de toros Brown Swiss. Revista de Investigación Veterinaria del Perú. 30(1): 500-506. DOI:10.15381/rivep.v30i1.14696

Orrego, F. J. (2022). Características espermáticas y testiculares en dos edades y tres razas de cuyes. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Lima. Perú. pp: 32-52.

Ortiz, P.; Florián, A.; Estela, J.; Rivera, M.; Hobán, C.; Murga, C. (2021). Caracterización de la crianza de cuyes en tres provincias de la Región Cajamarca, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 32(2): 1-9. DOI:10.15381/rivep.v32i2.20019

Paez, E. M. (2011). Módulo Reproducción Animal Avanzada. (U. N. Distancia, Ed.) pp: 48-49.

Paredes, M.; Guevara, J.; Mantilla, J.; Ortiz, P. (2020). Características del semen y desempeño reproductivo de cuyes nativos y mejorados en cruzamiento recíproco. *Spermova*. 10(1): 11-17. DOI:10.18548/aspe/0008.02

Pérez, M.; Román, B.; Santiani, A. (2020). Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de espermatozoides viables de alpaca evaluada mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 31(3): 1-9. DOI:10.15381/rivep.v31i3.18172

Pinduisaca, K. F. (2018). Colecta y evaluación de semen de cuyes (*Cavia porcellus*), extraído por la técnica de electroeyaculación en el Centro Experimental Uyumbicho. [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Quito. Ecuador. pp: 22-41.

Qhishpe, J. A. (2021). Evaluación de dos curvas de congelación programables para la crioconservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) en el Centro Experimental Uyumbicho. [Tesis pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Quito. Ecuador. pp: 18-34.

Quesenberry, K. E.; Donnelly, T. M.; Mans, C. (2012). Ferrets, Rabbits, and Rodents. (K. E. Quesenberry; J. W. Carpenter, Edits.) DOI:10.1016/B978-1-4160-6621-7.00022-1

Quispe, H. A.; Aguilar, J.; Valdivia, J. C.; Segura, G.; Milla, M. E.; Cayo, I. S. (2021). Effect of Photoperiod with Sunlight at Thermal Stress and Sperm Parameters in Guinea Pigs. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 24(12): 1297-1308. DOI:10.3923/pjbs.2021.1297.1308

Quispe, W. (2018). Características espermáticas y calidad del semen de dos razas de cuyes (*Cavia porcellus*), en el valle de Cajamarca. [Tesis de Postgrado, Universidad Nacional de Cajamarca]. Cajamarca. Perú. pp: 53-82.

Raju, R.; Bryant, S. J.; Wilkinson, B. L.; Bryant, G. (2021). The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1865(1). DOI:10.1016/j.bbagen.2020.129749

Rodríguez, F. A.; Ávila, C. O.; Anchondo, A.; Sánchez, B.; Jiménez, J. A. (2008). Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia*. 42(4): 399-406.

Rodríguez, L. A. (1979). Producción de cuyes. Editorial U. N. Perú.

Rosales, C. A.; Guevara, G.; Perea, F.; Ayala, L.; Escandón, P. N. (2021). Morfometría de la gónada masculina y espermatozoides de cobayos (*Cavia porcellus*) nativo y mejorado del sur de Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 32(2). DOI:10.15381/rivep.v32i2.17988

Rosero, M. A.; Núñez, O. P.; Lozada, E. E. (2018). Evaluación de tres diluyentes naturales para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. 5(1): 23-32.

Rubio, J. L.; Quintero, A. A.; González, D. M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*. 19(4): 382-389.

Santiani, A.; Huanca, W.; Sapana, R.; Huanca, T.; Sepúlveda, N.; Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology*. 7(3): 303-309. DOI:10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x

Santiani, A.; Sandoval, R.; Ruiz, L. F.; Coronado, L. (2004). Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico. XXVII Reunión APPA. Piura: Asociación Peruana de Producción Animal.

Souza T. (2009). Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor* LINNAEUS, 1771) adultos. [Tesis Magister, Universidad Federal de Viçosa] Viçosa. Brasil. pp:64-65.

Stan, F. G. (2015). Anatomical Particularities of Male Reproductive System of Guinea Pigs (*Cavia porcellus*). *Veterinary Medicine*. 2(72). DOI:10.15835/buasvmcn-vm:11410

Suárez, C.; Sierra, A.; Restrepo, D.; Duque, J. E.; Restrepo, G. (2020). Evaluación de diluyentes para la refrigeración de semen de conejo (*Oryctolagus*

cuniculus). Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 31(2). DOI:10.15381/rivep.v31i2.17857

Taday, F. A. (2022). Valoración microscópica de la calidad del semen de cuy. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Tapia, D. A.; Tello, D. J. (2016). Evaluación cuali-cuantitativa de espermatozoides de la cola del epidídimo de cuyes (*Cavia porcellus*) criollos y mejorados en dos edades reproductivas. [Tesis de Pregrado, Universidad de Cuenca]. Cuenca. Ecuador. pp:44-68.

Tartaglione, C.; Ritta, M. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology. 62(7): 1245-1252. DOI:10.1016/j.theriogenology.2004.01.012

Teves, M. E.; Roldan, E. R. (2022). Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. Physiological Reviews. (102): 7-60. DOI:10.1152/physrev.00009.2020

Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48(1): 33-34.

Unchupaico, I.; Alponente, A.; Barrera, S. (2006). Motilidad y concentración espermática del líquido seminal del epidídimo de cuyes de varias edades criados en el valle del Mantaro. Prospectiva universitaria. 1(2): 98-99. DOI:10.26490/uncp.prospectivauniversitaria.2006.3.1297

Váradi, É.; Végi, B.; Liptói, K.; Barna, J. (2013). Methods for Cryopreservation of Guinea Fowl Sperm. PLOS ONE. 8(4): 1-6. DOI:10.1371/journal.pone.0062759

Viñán, H. P.; Paucar, J. E.; Alvarado, E. (2019). Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian. Revista de Investigación Veterinaria del Perú. 30(4): 1611-1618. DOI:10.15381/rivep.v30i4.17159

Zúñiga, B. D.; Quisiyupanqui, L. (1995). Manejo del cuy (Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - Dirección Universitaria de Investigación ed.). Alpha. Cusco, Perú. pp: 112-201.

Zúñiga, H.; Pinto, M.; Hernández, J. I.; Torres, O. M. (2002). Revisión taxonómica de las especies del género *Cavia* (Rodentia:Caviidae) en Colombia. *Acta zoológica mexicana*. (87): 111-123.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Peso vivo de los cuyes evaluados.

N°	CÓDIGO	LINEA	PESO VIVO (gr.)
1	22N51	Perú	1192.5
2	22S56	Perú	1276.3
3	22D04	Perú	1187.8
4	22D09	Perú	1221.6
5	22N71	Perú	1354.8
6	22J65C	Inti	1523.7
7	SN4	Inti	1108.4
8	23E18	Inti	1125.8
9	22N55	Inti	1130
10	22T17	Inti	1154.7
11	23E15	Inti	1099.5
12	22D15	Andino	1116.6
13	22D66	Andino	1073.3
14	22D63	Andino	1181.8
15	22T38	Andino	1135.9
16	23E35	Andino	1080.6

Anexo 2. Concentración de las muestras espermáticas evaluadas.

N°	CÓDIGO	LINEA	EPIDIDIMO DERECHO			EPIDIDIMO IZQUIERDO			GENERAL		
			VR	Ezp. / ml	Ezp. total	VR	Ezp. / ml	Ezp. total	VR	Ezp. / ml	Ezp. total
			(ml)	(x10 ⁶)		(ml)	(x10 ⁶)		(ml)	(x10 ⁶)	
1	22N51	Perú	2.00	31.61	63.21	2.00	35.18	70.36	4.00	33.39	133.57
2	22S56	Perú	2.00	36.96	73.93	2.20	25.89	56.96	4.20	31.43	130.89
3	22D04	Perú	2.00	36.07	72.14	2.00	60.71	121.43	4.00	48.39	193.57
4	22D09	Perú	2.00	41.43	82.86	2.10	38.75	81.38	4.10	40.09	164.23
5	22N71	Perú	2.20	72.32	159.11	2.10	63.21	132.75	4.30	67.77	291.86
6	22J65C	Inti	1.90	35.00	66.50	2.10	57.14	120.00	4.00	46.07	186.50
7	SN4	Inti	2.00	42.68	85.36	2.40	42.50	102.00	4.40	42.59	187.36
8	23E18	Inti	2.00	31.61	63.21	2.00	40.36	80.71	4.00	35.98	143.93
9	22N55	Inti	2.10	48.39	101.63	2.10	52.32	109.88	4.20	50.36	211.50
10	22T17	Inti	2.00	55.00	110.00	2.10	45.71	96.00	4.10	50.36	206.00
11	23E15	Inti	2.20	61.07	134.36	2.00	51.07	102.14	4.20	56.07	236.50
12	22D15	Andino	2.00	63.75	127.50	2.10	40.71	85.50	4.10	52.23	213.00
13	22D66	Andino	2.10	46.79	98.25	2.10	24.11	50.63	4.20	35.45	148.88
14	22D63	Andino	2.00	52.14	104.29	2.20	38.39	84.46	4.20	45.27	188.75
15	22T38	Andino	2.20	16.43	36.14	2.10	54.29	114.00	4.30	35.36	150.14
16	23E35	Andino	2.10	80.54	169.13	2.20	91.79	201.93	4.30	86.16	371.05
Promedio			2.05	46.99	96.73	2.11	47.63	100.63	4.16	47.31	197.36
DS (±)			0.09	16.65	36.54	0.10	16.35	35.56	0.13	14.11	62.44

Leyenda: Ezp = Espermatozoides. DS = Desviación estándar. VR = Volumen de recuperación.

Anexo 3. Fotografías de los parámetros evaluados en las muestras espermáticas.

- **CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA**



Recuento en cámara Neubauer

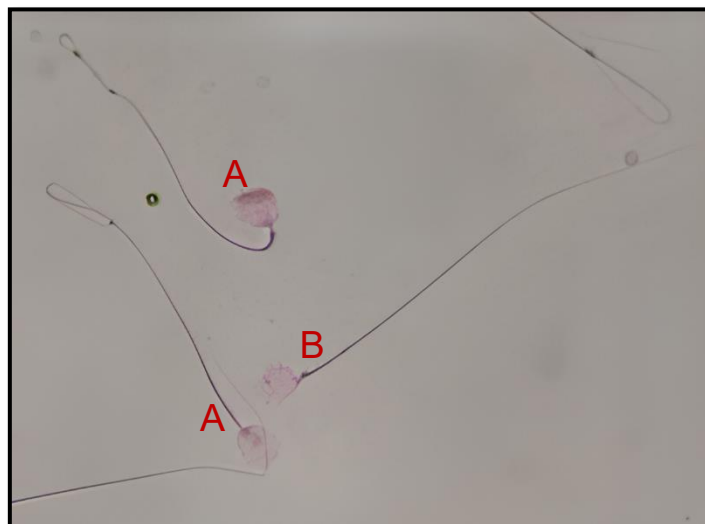
- **VITALIDAD ESPERMÁTICA**



Tinción con Eosina

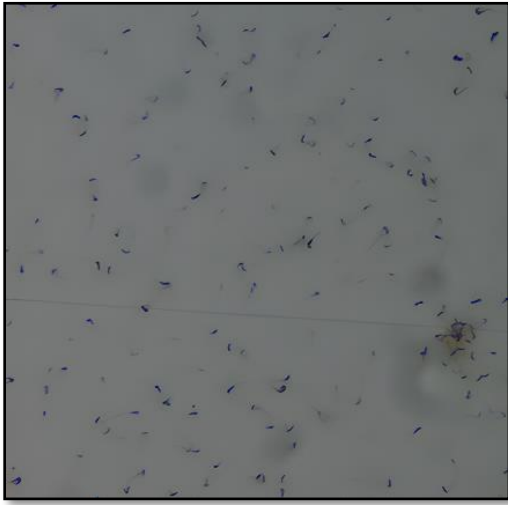
A = Espermatozoide vivo (Blanco).
B = Espermatozoide muerto (Rojo)

- **PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE MEMBRANA (HOS TEST)**

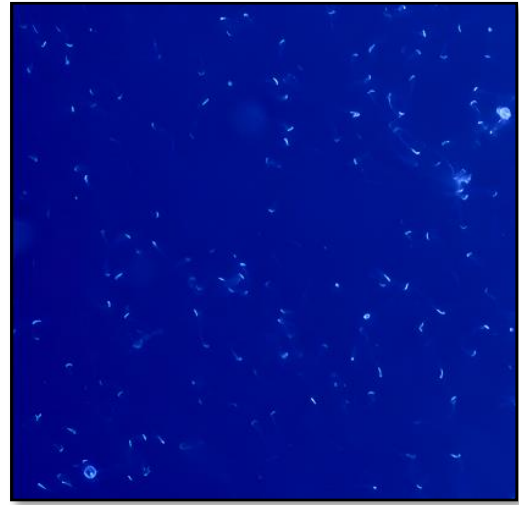


A = Espermatozoide con membrana intacta (Reacción +).
B = Espermatozoide con membrana dañada (Sin reacción)

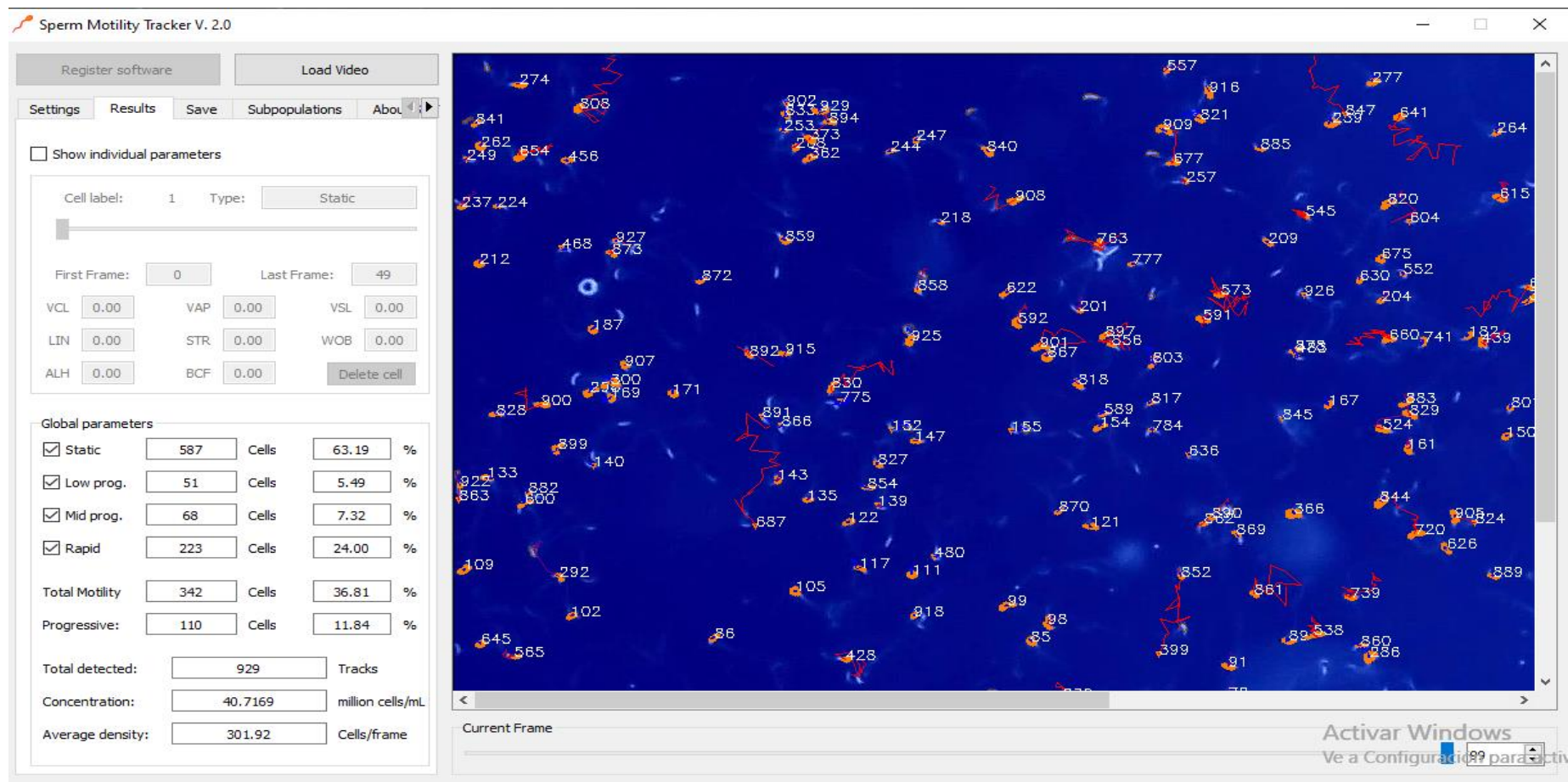
- **MOTILIDAD ESPERMÁTICA**



Grabación de motilidad



**Grabación de motilidad con
filtro**



Análisis de motilidad espermática con el Software Sperm Motility Tracker V. 2.0

Anexo 4. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad en muestras espermáticas en un tiempo de exposición inicial (0 Horas)

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> DATOS<-read.csv('DATOSM0HORAS.csv', sep = ";", header = T)
> #head(DATOS)
> DATOS$RAZA <- as.factor(DATOS$RAZA)
> DATOS$DILUTOR <- as.factor(DATOS$DILUTOR)
> #DATOS$E_CORTE <- as.factor(DATOS$E_CORTE)
> #
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> #GENERAR MODELO ADITIVO
> MODELO1 <- aov(VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)
> #
> #ANALISIS DE VARIANZA
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: VR1
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
DILUTOR    2   343.6   171.81   1.6146 0.21080
RAZA       2  1270.6   635.30   5.9704 0.00515 **
Residuals 43  4575.6   106.41
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> #
> # COMPARACION DE MEDIAS prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)

$DILUTOR
              diff             lwr             upr             p adj
OptiXcell-Andromed    6.553792   -2.299225  15.406809  0.1826684
Tris - Yema-Andromed    3.283528   -5.569489  12.136545  0.6430362
Tris - Yema-OptiXcell  -3.270264  -12.123282    5.582753  0.6453024

$RAZA
              diff             lwr             upr             p adj
BLANCO-BAYO  -10.2311493  -18.985247  -1.477052  0.0185967
RUANO-BAYO   -10.9877097  -19.741807  -2.233612  0.0107876
RUANO-BLANCO  -0.7565603   -9.899917    8.386796  0.9780162

> #
> library(agricolae)
> outHSD1 <-HSD.test(MODELO1, "DILUTOR",console=TRUE)

Study: MODELO1 ~ "DILUTOR"

HSD Test for VR1

Mean Square Error:  106.4083

DILUTOR, means
      VR1      std  r      se      Min      Max      Q25      Q50      Q75
Andromed  48.96015 10.97435 16  2.57886 23.70690 62.16216 46.61364 51.32880 55.36934
OptiXcell  55.51394 10.49054 16  2.57886 31.62791 66.99670 52.08990 59.36294 62.44942
Tris - Yema 52.24368 12.61965 16  2.57886 23.50000 77.46479 48.74687 52.90095 56.17185

Alpha: 0.05 ; DF Error: 43
Critical Value of Studentized Range: 3.432918

Minimun Significant Difference: 8.853017
```

Treatments with the same letter are not significantly different.

```

              VR1 groups
OptiXcell    55.51394      a
Tris - Yema  52.24368      a
Andromed     48.96015      a
> outHSD2 <-HSD.test(MODELO1, "RAZA",console=TRUE)
```

Study: MODELO1 ~ "RAZA"

HSD Test for VR1

Mean Square Error: 106.4083

RAZA, means

	VR1	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BAYO	58.87015	7.742758	18	2.431373	47.61905	77.46479	53.31226	58.36682	63.51351
BLANCO	48.63900	11.792279	15	2.663435	23.70690	63.67521	44.70147	50.70423	58.17686
RUANO	47.88244	11.811650	15	2.663435	23.50000	60.66176	47.03846	52.13675	54.47716

Alpha: 0.05 ; DF Error: 43

Critical Value of Studentized Range: 3.432918

Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

Treatments with the same letter are not significantly different.

```

              VR1 groups
BAYO      58.87015      a
BLANCO    48.63900      b
RUANO     47.88244      b
> #
```

Anexo 5. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides con reacción HOS positiva, en muestras a tiempo de exposición inicial (0 Horas)

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> DATOS<-read.csv('DATOSM0HORAS.csv', sep = ";", header = T)
> #head(DATOS)
> DATOS$RAZA <- as.factor(DATOS$RAZA)
> DATOS$DILUTOR <- as.factor(DATOS$DILUTOR)
> #DATOS$E_CORTE <- as.factor(DATOS$E_CORTE)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
#
> #GENERAR MODELO ADITIVO
> MODELO1 <- aov(VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)
> #
> #ANALISIS DE VARIANZA
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: VR1
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
DILUTOR    2  201.4   100.69   0.5683 0.5707
RAZA       2  445.6   222.78   1.2574 0.2946
Residuals 43 7618.5   177.17
> #
> # COMPARACION DE MEDIAS prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
      Tukey multiple comparisons of means
      95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)

$DILUTOR
              diff            lwr            upr      p adj
OptiXcell-Andromed    2.050026   -9.373576   13.473628 0.9009331
Tris - Yema-Andromed -2.940775  -14.364377    8.482827 0.8073173
Tris - Yema-OptiXcell -4.990801  -16.414403    6.432801 0.5434253

$RAZA
              diff            lwr            upr      p adj
BLANCO-BAYO  1.628475  -9.667485   12.92443 0.9348262
RUANO-BAYO   7.151354  -4.144606   18.44731 0.2841333
RUANO-BLANCO 5.522880  -6.275366   17.32113 0.4973449

> plot(TukeyHSD(MODELO1))
> #
> library(agricolae)
> outHSD1 <-HSD.test(MODELO1, "DILUTOR",console=TRUE)

Study: MODELO1 ~ "DILUTOR"

HSD Test for VR1

Mean Square Error:  177.1737

DILUTOR,  means
              VR1      std  r      se      Min      Max      Q25      Q50      Q75
Andromed    28.98518 10.98675 16 3.327665 13.52941 52.35849 20.65217 29.38203 33.01541
OptiXcell   31.03520 15.44664 16 3.327665 14.63415 64.48980 20.57259 24.01440 35.46216
Tris - Yema 26.04440 13.35272 16 3.327665 10.14493 54.36893 15.73625 20.94767 32.24348

Alpha: 0.05 ; DF Error: 43
Critical Value of Studentized Range: 3.432918

Minimun Significant Difference: 11.4236
```

Treatments with the same letter are not significantly different.

		VR1 groups
OptiXcell	31.03520	a
Andromed	28.98518	a
Tris - Yema	26.04440	a

```
> outHSD2 <-HSD.test(MODELO1, "RAZA",console=TRUE)
```

Study: MODELO1 ~ "RAZA"

HSD Test for VR1

Mean Square Error: 177.1737

RAZA, means

	VR1	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BAYO	25.94456	12.594412	18	3.137353	13.52941	54.36893	20.28986	20.68690	26.21474
BLANCO	27.57304	7.860164	15	3.436798	14.63415	39.51220	21.04881	29.57746	33.22523
RUANO	33.09592	17.440452	15	3.436798	10.14493	64.48980	19.08092	30.00000	45.13081

Alpha: 0.05 ; DF Error: 43

Critical Value of Studentized Range: 3.432918

Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

Treatments with the same letter are not significantly different.

		VR1 groups
RUANO	33.09592	a
BLANCO	27.57304	a
BAYO	25.94456	a

Anexo 6. Análisis de varianza para el porcentaje de motilidad total en muestras espermáticas en un tiempo de exposición inicial (0 Horas)

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023")
> DATOS<-read.csv('datamotilidad.csv', sep = ";", header = T)
> #head(DATOS)
> DATOS$RAZA <- as.factor(DATOS$RAZA)
> DATOS$DILUTOR <- as.factor(DATOS$DILUTOR)
> #DATOS$E_CORTE <- as.factor(DATOS$E_CORTE)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> #GENERAR MODELO ADITIVO
> MODELO1 <- aov(VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)
> #
> #ANALISIS DE VARIANZA
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: VR1
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
DILUTOR    2  8064.8   4032.4  35.5989 3.287e-13 ***
RAZA       2   567.2    283.6   2.5037  0.08547 .
Residuals 139 15745.0    113.3
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> #
> # COMPARACION DE MEDIAS prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
    Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)

$DILUTOR
              diff            lwr            upr         p adj
OptiXcell-AndroMed  14.320417    9.173588   19.467245 0.0000000
TRIS-Yema-AndroMed  -2.750417   -7.897245    2.396412 0.4167789
TRIS-Yema-OptiXcell -17.070833  -22.217662  -11.924005 0.0000000

$RAZA
              diff            lwr            upr         p adj
BLANCO-BAYO  -4.1685556   -9.257876    0.9207648 0.1312654
RUANO-BAYO   -4.0272222   -9.116543    1.0620982 0.1498862
RUANO-BLANCO  0.1413333   -5.174288    5.4569551 0.9978149

> plot(TukeyHSD(MODELO1))
> #
> library(agricolae)
> outHSD1 <-HSD.test(MODELO1, "DILUTOR",console=TRUE)

Study: MODELO1 ~ "DILUTOR"

HSD Test for VR1

Mean Square Error:  113.2736

DILUTOR,  means

          VR1      std  r      se  Min  Max   Q25   Q50   Q75
AndroMed  36.49604 11.962063 48 1.536186 16.41 63.00 25.2125 35.250 47.5575
OptiXcell 50.81646 11.853668 48 1.536186 21.93 67.50 42.8600 54.825 58.1350
TRIS-Yema 33.74562  7.966707 48 1.536186 17.12 48.72 26.0350 34.185 40.0875

Alpha: 0.05 ; DF Error: 139
Critical Value of Studentized Range: 3.350395

Minimun Significant Difference: 5.146829
```

Treatments with the same letter are not significantly different.

```
          VR1 groups
OptiXcell 50.81646      a
AndroMed  36.49604      b
TRIS-Yema 33.74562      b
```

```
> outHSD2 <-HSD.test(MODELO1, "RAZA",console=TRUE)
```

Study: MODELO1 ~ "RAZA"

HSD Test for VR1

Mean Square Error: 113.2736

RAZA, means

	VR1	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BAYO	42.91389	10.42069	54	1.448330	21.55	61.37	35.25	40.64	51.38
BLANCO	38.74533	14.45799	45	1.586566	17.12	67.50	25.10	35.91	53.18
RUANO	38.88667	14.18793	45	1.586566	16.41	67.23	26.11	38.36	49.06

Alpha: 0.05 ; DF Error: 139

Critical Value of Studentized Range: 3.350395

Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

Treatments with the same letter are not significantly different.

```
          VR1 groups
BAYO     42.91389      a
RUANO    38.88667      a
BLANCO   38.74533      a
```

Anexo 7. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides ViCA en muestras espermáticas en un tiempo de exposición inicial (0 Horas)

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA/TIPOS")
> DATOS<-read.csv('DATOSAC_0H.csv', sep = ";", header = T)
> #head(DATOS)
> DATOS$RAZA <- as.factor(DATOS$RAZA)
> DATOS$DILUTOR <- as.factor(DATOS$DILUTOR)
> #DATOS$E_CORTE <- as.factor(DATOS$E_CORTE)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> #GENERAR MODELO ADITIVO
> MODELO1 <- aov(VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)
> #
> #ANALISIS DE VARIANZA
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: VR1
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
DILUTOR    2   552.0   276.01   3.0194 0.059287 .
RAZA       2  1456.0   727.99   7.9639 0.001142 **
Residuals 43  3930.7    91.41
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> #
> # COMPARACION DE MEDIAS prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
    Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ DILUTOR + RAZA, data = DATOS)

$DILUTOR
              diff              lwr              upr              p adj
OptiXcell-Andromed      3.025802     -5.179677  11.231281666 0.6462728
Tris - Yema-Andromed    -5.186747    -13.392226   3.018732723 0.2852070
Tris - Yema-OptiXcell   -8.212549    -16.418028  -0.007069405 0.0497616

$RAZA
              diff              lwr              upr              p adj
BLANCO-BAYO    -11.6544363    -19.768232  -3.540641 0.0032067
RUANO-BAYO     -11.0788128    -19.192608  -2.965017 0.0052110
RUANO-BLANCO    0.5756235     -7.898959   9.050206 0.9851296

> plot(TukeyHSD(MODELO1))
> #
> library(agricolae)
> outhSD1 <-HSD.test(MODELO1, "DILUTOR",console=TRUE)

Study: MODELO1 ~ "DILUTOR"

HSD Test for VR1

Mean Square Error:  91.41153

DILUTOR,  means

              VR1      std  r      se      Min      Max      Q25      Q50      Q75
Andromed    50.17207 10.09491 16 2.390234 27.77778 63.98104 47.04737 53.66753 56.95352
OptiXcell   53.19787 11.26137 16 2.390234 29.57746 68.57143 49.17241 55.30349 58.59031
Tris - Yema 44.98532 11.41869 16 2.390234 20.00000 61.68224 42.53909 46.86163 52.91262

Alpha: 0.05 ; DF Error: 43
Critical Value of Studentized Range: 3.432918

Minimun Significant Difference: 8.20548
```

Treatments with the same letter are not significantly different.

```
VR1 groups
OptiXcell  53.19787      a
Andromed   50.17207     ab
Tris - Yema 44.98532      b
> outHSD2 <-HSD.test(MODELO1, "RAZA",console=TRUE)
```

Study: MODELO1 ~ "RAZA"

HSD Test for VR1

Mean Square Error: 91.41153

RAZA, means

	VR1	std	r	se	Min	Max	Q25	Q50	Q75
BAYO	56.55590	6.13533	18	2.253535	45.70136	68.57143	53.40540	56.80715	58.59031
BLANCO	44.90146	12.65118	15	2.468623	20.00000	66.06335	38.68394	46.66667	50.93121
RUANO	45.47708	10.69735	15	2.468623	21.62162	56.30631	42.73504	47.41784	53.43974

Alpha: 0.05 ; DF Error: 43

Critical Value of Studentized Range: 3.432918

Groups according to probability of means differences and alpha level(0.05)

Treatments with the same letter are not significantly different.

```
VR1 groups
BAYO  56.55590      a
RUANO  45.47708      b
BLANCO 44.90146      b
```

Anexo 8. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C

```
setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
#
### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
DATOS1<-read.csv('DATOSM24HORAS.csv', header = T, sep= ";")
DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
library(car)
library(emmeans)
library(psych)
#
# ESTADISTICA DESCRIPTIVA
#
#generar subconjuntos por raza
ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
#
#generar subconjuntos por DILUTOR
Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
#
#variable de estudio en sub grupos
#en razas
a<-ruano$Porc_Vit
b<-blanco$Porc_Vit
c<-bayo$Porc_Vit
#en dilutor
d<-Tris$Porc_Vit
e<-OptiXcell$Porc_Vit
f<-Andromed$Porc_Vit
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean   sd median trimmed  mad   min   max range  skew kurtosis  se
X1    1 15 44.61 11.62  48.64   45.28  7.11 21.68 58.82 37.14 -0.87    -0.7   3
> describe(b)
  vars  n mean   sd median trimmed  mad   min   max range  skew kurtosis  se
X1    1 15 43.96 10.12  45.53   44.57  5.25 23.47 56.56 33.08 -0.81    -0.34 2.61
> describe(c)
  vars  n mean   sd median trimmed  mad   min   max range  skew kurtosis  se
X1    1 18 51.95  5.62  51.82   52.07   7 42.57 59.51 16.94 -0.16    -1.56 1.32
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean   sd median trimmed  mad   min   max range  skew kurtosis  se
X1    1 16 44.41  9.88  46.7   45.03  6.34 21.68 58.45 36.77 -1.07     0.36 2.47
> describe(e)
  vars  n mean   sd median trimmed  mad   min   max range  skew kurtosis  se
X1    1 16 51.51  8.58  54.44   52.51  4.02 29.5 59.51 30.01 -1.39     0.78 2.14
> describe(f)
  vars  n mean   sd median trimmed  mad   min   max range  skew kurtosis  se
X1    1 16 45.56  9.98  47.29   46.27  5.12 22.64 58.45 35.81 -1.16     0.56 2.49
> #
> #
> VR1<-DATOS1$Porc_Vit
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(Porc_Vit ~ Porc_Vit_0h + DILUTOR + RAZA, data=DATOS1)
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: Porc_Vit
          Df Sum Sq Mean Sq  F value    Pr(>F)
Porc_Vit_0h 1 3563.8   3563.8 197.1602 < 2.2e-16 ***
DILUTOR      2  189.9     95.0   5.2534 0.009198 **
RAZA         2   12.5      6.2   0.3446 0.710506
Residuals   42  759.2     18.1
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
```

```

> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
  DILUTOR      emmean    SE df lower.CL upper.CL
Andromed      48.1 1.09 42      45.9      50.3
OptiXcell      49.0 1.08 42      46.9      51.2
Tris - Yema     44.4 1.06 42      42.3      46.6

Results are averaged over the levels of: RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
  contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
Andromed - OptiXcell      -0.979 1.56 42   -0.628  0.8055
Andromed - (Tris - Yema)    3.638 1.52 42    2.398  0.0537
OptiXcell - (Tris - Yema)    4.618 1.52 42    3.044  0.0110

Results are averaged over the levels of: RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
  RAZA      emmean    SE df lower.CL upper.CL
BAYO      46.9 1.09 42      44.7      49.1
BLANCO     46.7 1.12 42      44.4      49.0
RUANO      47.9 1.13 42      45.6      50.2

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
  contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
BAYO - BLANCO      0.224 1.62 42    0.138  0.9896
BAYO - RUANO     -1.001 1.64 42   -0.611  0.8151
BLANCO - RUANO    -1.224 1.55 42   -0.788  0.7122

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")

```

Anexo 9. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides con reacción HOS Positiva en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSM24HORAS.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$Porc_REACT
> b<-blanco$Porc_REACT
> c<-bayo$Porc_REACT
> #en dilutor
> d<-Tris$Porc_REACT
> e<-OptiXcell$Porc_REACT
> f<-Andromed$Porc_REACT
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 25.17 9.67 23.65 25.22 6.62 7.5 42.15 34.65 0.06 -0.98 2.5
> describe(b)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 19.05 5.29 17.39 18.88 7.25 11.71 28.57 16.86 0.23 -1.42 1.37
> describe(c)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 18 19.96 7.85 17.94 19.5 4.56 8.42 38.86 30.45 0.76 -0.2 1.85
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 17.16 6.98 16.42 16.94 6.7 7.5 29.85 22.35 0.46 -1.01 1.75
> describe(e)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 24.13 7.33 23.77 23.73 6.75 14.9 38.86 23.96 0.71 -0.72 1.83
> describe(f)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 22.62 8.61 20.99 21.94 7.21 12.5 42.15 29.65 0.83 -0.44 2.15
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = REACCION HOST
> VR1<-DATOS1$Porc_REACT
> #
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(Porc_REACT ~ Porc_REACT_0h + DILUTOR + RAZA, data=DATOS1)
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: Porc_REACT
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Porc_REACT_0h 1 1733.42 1733.42 71.0561 1.419e-10 ***
DILUTOR        2 213.52 106.76 4.3763 0.01878 *
RAZA           2 108.33 54.17 2.2204 0.12115
Residuals     42 1024.60 24.40
```

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
  DILUTOR      emmean    SE df lower.CL upper.CL
Andromed      22.5 1.24 42      20.0      25.0
OptiXcell      23.2 1.24 42      20.7      25.7
Tris - Yema     18.3 1.24 42      15.8      20.8

Results are averaged over the levels of: RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
  contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
Andromed - OptiXcell    -0.666 1.75 42   -0.380  0.9235
Andromed - (Tris - Yema)  4.246 1.75 42    2.421  0.0510
OptiXcell - (Tris - Yema)  4.912 1.77 42    2.777  0.0218

Results are averaged over the levels of: RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
  RAZA      emmean    SE df lower.CL upper.CL
BAYO      21.1 1.17 42      18.7      23.5
BLANCO     19.5 1.28 42      16.9      22.1
RUANO      23.4 1.30 42      20.7      26.0

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
  contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
BAYO - BLANCO      1.58 1.73 42    0.916  0.6331
BAYO - RUANO       -2.26 1.77 42   -1.275  0.4172
BLANCO - RUANO     -3.85 1.83 42   -2.101  0.1019

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")
> #

```

Anexo 10. Análisis de varianza para el porcentaje de motilidad total en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023")
> #
> ### OBJETIVO ###
> DATOS1<-read.csv('datamotilidad.csv', header = T, sep= ";")
> #str(DATOS1)
> #head(DATOS1)
> DATOS1$COD<-as.factor(DATOS1$COD)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$REPET<-as.factor(DATOS1$REPET)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "TRIS-Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "AndroMed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$P_Total_motility_24H
> b<-blanco$P_Total_motility_24H
> c<-bayo$P_Total_motility_24H
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$Total_motility_24H
> bl<-blanco$Total_motility_24H
> cl<-bayo$Total_motility_24H
> #en dilutor
> d<-Tris$P_Total_motility_24H
> e<-OptiXcell$P_Total_motility_24H
> f<-Andromed$P_Total_motility_24H
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$Total_motility_24H
> el<-OptiXcell$Total_motility_24H
> fl<-Andromed$Total_motility_24H
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  45 31.97  8.49  30.43   31.91 5.97 14.97 48.72 33.75 0.25   -0.59 1.27
> describe(al)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  45 194.24 106.13   177  185.3 83.03 39 438  399 0.87   -0.28 15.82
> describe(b)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  45 31.11 10.81   32.7   31.19 9.58 9.52 55.23 45.71 -0.18   -0.54 1.61
> describe(bl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  45 173.11 105.51   175  165.73 131.95 26 463  437 0.5   -0.33 15.73
> describe(c)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  54 33.88 10.54   32.62  33.72 6.88 8.8 61.34 52.54 0.28    0.15 1.43
> describe(cl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  54 273.19 154.08   264  260.98 160.12 30 633  603 0.64   -0.21 20.97
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  48 26.95  7.79   28.55   27.36 6.26 8.8 45.25 36.45 -0.53   -0.01 1.12
> describe(dl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  48 229.23 125.57   219   227.7 152.71 26 492  466 0.05   -1.1 18.12
> describe(e)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  48 41.26  8.15   40.77   41.18 10.22 27.13 61.34 34.21 0.14   -0.85 1.18
> describe(el)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  48 271.46 156.23  225.5  254.22 136.4  76 633  557 0.86   -0.31 22.55
> describe(f)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  48 29.03  7.56   30.43   29.21 5.6 9.95 44.65 34.7 -0.38   -0.03 1.09
> describe(fl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1  48 151.04 76.84  146.5  149.1 91.18 26 324  298 0.14   -1.02 11.09
```

```

> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = SPZ PROGRESIVO RAPIDO 24H
> VR1<-DATOS1$P_Total_motility_24H
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(VR1 ~ P_Total_motility_0H + DILUTOR + REPET%in%DILUTOR + RAZA + DILUTOR*RAZA,
data=DATOS1)
#
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: VR1

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
P_Total_motility_0H	1	5371.2	5371.2	103.4579	< 2.2e-16 ***
DILUTOR	2	1688.6	844.3	16.2631	5.087e-07 ***
RAZA	2	63.5	31.8	0.6119	0.5439
DILUTOR:REPET	6	282.1	47.0	0.9057	0.4930
DILUTOR:RAZA	4	349.7	87.4	1.6838	0.1577
Residuals	128	6645.3	51.9		

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
NOTE: A nesting structure was detected in the fitted model:
      REPET %in% DILUTOR
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)

```

DILUTOR	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
AndroMed	30.0	1.07	128	27.9	32.1
OptiXcell	38.5	1.21	128	36.1	40.9
TRIS-Yema	28.6	1.12	128	26.4	30.8

```

Results are averaged over the levels of: REPET, RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")

```

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
AndroMed - OptiXcell	-8.45	1.70	128	-4.979	<.0001
AndroMed - (TRIS-Yema)	1.45	1.49	128	0.974	0.5946
OptiXcell - (TRIS-Yema)	9.90	1.79	128	5.530	<.0001

```

Results are averaged over the levels of: REPET, RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)

```

RAZA	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
BAYO	33.2	0.992	128	31.3	35.2
BLANCO	31.5	1.078	128	29.4	33.6
RUANO	32.3	1.078	128	30.2	34.5

```

Results are averaged over the levels of: REPET, DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")

```

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
BAYO - BLANCO	1.727	1.48	128	1.171	0.4729
BAYO - RUANO	0.906	1.47	128	0.615	0.8124
BLANCO - RUANO	-0.821	1.52	128	-0.540	0.8516

```

Results are averaged over the levels of: REPET, DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")
> #

```

Anexo 11. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides ViCA en muestras espermáticas refrigeradas por 24 horas a 5°C

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA/TIPOS")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSAC_24H.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$P_ViCA
> b<-blanco$P_ViCA
> c<-bayo$P_ViCA
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$ViCA
> bl<-blanco$ViCA
> cl<-bayo$ViCA
> #en dilutor
> d<-Tris$P_ViCA
> e<-OptiXcell$P_ViCA
> f<-Andromed$P_ViCA
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$ViCA
> el<-OptiXcell$ViCA
> fl<-Andromed$ViCA
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 32.38 9.92  31.25   32.09 9.93 19.62 49.01 29.39 0.27   -1.28 2.56
> describe(al)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 68.53 20.33    65   68.31 29.65  41  99    58  0.1   -1.51 5.25
> describe(b)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 40.07 10.02  39.74   40.94 12.36 17.39 51.54 34.15 -0.69   -0.6 2.59
> describe(bl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 87.27 22.67    94   88.92 14.83  36 117    81 -0.76   -0.49 5.85
> describe(c)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 18 51.15 6.43  51.66   51.53 3.85 34.38 61.88 27.51 -0.77    0.49 1.52
> describe(cl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 18 109 12.24   110   110 9.64  77 125    48 -0.85    0.35 2.88
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 35.53 12.11  36.14   35.6 15.23 17.39 52.75 35.36 -0.07   -1.4 3.03
> describe(dl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 77.06 26.94    78   77.29 31.88  36 115    79 -0.18   -1.49 6.74
> describe(e)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 46.65 10.23  48.55   47.06 13.1 25.68 61.88 36.21 -0.46   -0.79 2.56
> describe(el)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad  min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 98.25 19.69   99.5   99.29 17.05  57 125    68 -0.54   -0.47 4.92
> describe(f)
```

```

vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 16 43.3 10.41 45.43 43.79 9.66 24.77 54.95 30.18 -0.64 -1.24 2.6
> describe(f1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 16 93.38 23.66 102 94.07 20.02 55 122 67 -0.56 -1.33 5.92
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = VIVOS CON ACROSOMA
> VR1<-DATOS1$P_ViCA
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(P_ViCA ~ P_ViCA_0h + DILUTOR + RAZA, data=DATOS1)
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: P_ViCA
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
P_ViCA_0h  1 3993.4  3993.4 143.2600 4.032e-15 ***
DILUTOR     2  188.9    94.5   3.3892  0.0432 *
RAZA        2 1082.3   541.1  19.4124 1.071e-06 ***
Residuals  42 1170.8    27.9
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
DILUTOR      emmean    SE df lower.CL upper.CL
Andromed     42.5 1.32 42    39.9    45.2
OptiXcell     44.2 1.35 42    41.4    46.9
Tris - Yema   37.7 1.39 42    34.9    40.5

Results are averaged over the levels of: RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
Andromed - OptiXcell    -1.63 1.88 42   -0.863  0.6660
Andromed - (Tris - Yema)  4.81 1.92 42   2.508  0.0417
OptiXcell - (Tris - Yema)  6.43 1.99 42   3.232  0.0066

Results are averaged over the levels of: RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
RAZA      emmean    SE df lower.CL upper.CL
BAYO     47.1 1.38 42    44.3    49.9
BLANCO    42.7 1.42 42    39.8    45.5
RUANO     34.6 1.40 42    31.8    37.5

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
BAYO - BLANCO     4.44 2.09 42   2.125  0.0970
BAYO - RUANO     12.46 2.07 42   6.024 <.0001
BLANCO - RUANO     8.02 1.93 42   4.157  0.0004

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")
> #
>

```

Anexo 12. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad en muestras criopreservadas en LN2

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSMPOSTCONGHORAS.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$Porc_Vit
> b<-blanco$Porc_Vit
> c<-bayo$Porc_Vit
> #en dilutor
> d<-Tris$Porc_Vit
> e<-OptiXcell$Porc_Vit
> f<-Andromed$Porc_Vit
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 15 2.47 2.6   1.9   2.08 1.38  0 10  10 1.63   2.11 0.67
> describe(b)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 15 2.51 1.46  1.83   2.45 1.56 0.47 5.34 4.87 0.36  -1.29 0.38
> describe(c)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 18 1.85 1.65  1.64   1.75 1.82  0 5.31 5.31 0.51  -0.96 0.39
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 3.57 2.27  3.26   3.27 1.9 1.29 10 8.71 1.29  1.39 0.57
> describe(e)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 1.54 1.4  1.41   1.5 2.09  0 3.67 3.67 0.19  -1.65 0.35
> describe(f)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 1.65 1.34  1.33   1.5 1.04  0 5.34 5.34 1.21  1.09 0.33
> #
> #
> VR1<-DATOS1$Porc_Vit
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(Porc_Vit ~ Porc_Vit_24h + DILUTOR + RAZA, data=DATOS1)
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: Porc_Vit
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Porc_Vit_24h 1    4.183   4.1828  1.3652 0.249221
DILUTOR      2   37.857  18.9286  6.1782 0.004446 **
RAZA         2    4.097   2.0484  0.6686 0.517800
Residuals   42  128.678   3.0638
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
```

```

> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
  DILUTOR      emmean      SE df lower.CL upper.CL
Andromed      1.68 0.442 42      0.786      2.57
OptiXcell      1.56 0.455 42      0.643      2.48
Tris - Yema     3.60 0.448 42      2.698      4.50

Results are averaged over the levels of: RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
  contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
Andromed - OptiXcell      0.117 0.644 42      0.181 0.9821
Andromed - (Tris - Yema) -1.924 0.620 42     -3.104 0.0094
OptiXcell - (Tris - Yema) -2.040 0.655 42     -3.117 0.0090

Results are averaged over the levels of: RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
  RAZA      emmean      SE df lower.CL upper.CL
BAYO      1.84 0.437 42      0.959      2.72
BLANCO     2.52 0.462 42      1.588      3.45
RUANO      2.48 0.458 42      1.554      3.40

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
  contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
BAYO - BLANCO    -0.6795 0.657 42     -1.034 0.5600
BAYO - RUANO     -0.6384 0.650 42     -0.982 0.5925
BLANCO - RUANO     0.0411 0.639 42      0.064 0.9977

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")
>

```

Anexo 13. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides con reacción HOS Positiva en muestras criopreservadas en LN2

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSMPOSTCONGHORAS.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$Porc_REACT
> b<-blanco$Porc_REACT
> c<-bayo$Porc_REACT
> #en dilutor
> d<-Tris$Porc_REACT
> e<-OptiXcell$Porc_REACT
> f<-Andromed$Porc_REACT
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 15 2.54 2.28  2.28  2.29  1 0.44 7.91  7.47 1.37  0.75 0.59
> describe(b)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 15 1.3 0.79  0.97  1.28 0.59  0 2.88  2.88 0.52 -0.78 0.2
> describe(c)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 18 1.52 1.17  1.36  1.41 0.68  0 4.81  4.81 1.26  1.19 0.28
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 1.8 1.75  0.99  1.52 0.65  0 7.56  7.56 2.11  4.45 0.44
> describe(e)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 2.26 1.86  1.64  1.99 1.15 0.44 7.91  7.47 1.73  2.66 0.47
> describe(f)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 1.25 0.9  0.94  1.19 0.72  0 3.37  3.37 0.72 -0.39 0.23
> #
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = REACCION HOST
> VR1<-DATOS1$Porc_REACT
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(Porc_REACT ~ Porc_REACT_24h + DILUTOR + RAZA, data=DATOS1)
> #
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: Porc_REACT
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Porc_REACT_24h 1 11.936 11.9365  5.5212 0.02356 *
DILUTOR        2  8.865  4.4325  2.0502 0.14139
RAZA          2  6.659  3.3295  1.5400 0.22623
Residuals     42 90.801  2.1619
---
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
```

```
> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
```

DILUTOR	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
Andromed	1.19	0.371	42	0.447	1.94
OptiXcell	2.13	0.379	42	1.367	2.89
Tris - Yema	2.02	0.388	42	1.237	2.80

Results are averaged over the levels of: RAZA
Confidence level used: 0.95

```
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
```

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
Andromed - OptiXcell	-0.936	0.522	42	-1.794	0.1839
Andromed - (Tris - Yema)	-0.826	0.546	42	-1.512	0.2955
OptiXcell - (Tris - Yema)	0.111	0.562	42	0.197	0.9789

Results are averaged over the levels of: RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

```
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
```

RAZA	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
BAYO	1.58	0.349	42	0.880	2.29
BLANCO	1.41	0.386	42	0.632	2.19
RUANO	2.35	0.398	42	1.548	3.15

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
Confidence level used: 0.95

```
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
```

contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
BAYO - BLANCO	0.173	0.515	42	0.337	0.9395
BAYO - RUANO	-0.766	0.538	42	-1.424	0.3377
BLANCO - RUANO	-0.940	0.569	42	-1.653	0.2352

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")

Anexo 14. Análisis de varianza para el porcentaje de motilidad total en muestras espermáticas criopreservadas en LN2

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023")
> #
> ### OBJETIVO ###
> DATOS1<-read.csv('datamotilidad.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$COD<-as.factor(DATOS1$COD)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$REPET<-as.factor(DATOS1$REPET)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "TRIS-Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "AndroMed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$P_Total_motility_cong
> b<-blanco$P_Total_motility_cong
> c<-bayo$P_Total_motility_cong
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$Total_motility_cong
> bl<-blanco$Total_motility_cong
> cl<-bayo$Total_motility_cong
> #en dilutor
> d<-Tris$P_Total_motility_cong
> e<-OptiXcell$P_Total_motility_cong
> f<-Andromed$P_Total_motility_cong
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$Total_motility_cong
> el<-OptiXcell$Total_motility_cong
> fl<-Andromed$Total_motility_cong
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 45 0.26 0.76     0   0.06  0  0 3.86  3.86 3.08    9.71 0.11
> describe(al)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 45 0.16 0.42     0   0.05  0  0  2    2 2.66    6.72 0.06
> describe(b)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 45 0.19 0.45     0   0.09  0  0 1.3   1.3 1.85    1.49 0.07
> describe(bl)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 45 0.16 0.37     0   0.08  0  0  1    1 1.84    1.41 0.05
> describe(c)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 54 0.19 0.83     0    0  0  0 4.96  4.96 4.48   20.27 0.11
> describe(cl)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 54 0.09 0.4     0    0  0  0  2    2 4.18   16.38 0.05
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 48 0.08 0.34     0    0  0  0 1.72  1.72 3.75   13.07 0.05
> describe(dl)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 48 0.06 0.24     0    0  0  0  1    1 3.5   10.49 0.04
> describe(e)
  vars  n mean   sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 48 0.22 0.58     0   0.09  0  0 2.84  2.84 2.7    7.22 0.08
> describe(el)
```

```

vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 0.17 0.43 0 0.07 0 0 2 2 2.48 5.71 0.06
> describe(f)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 0.34 1.01 0 0.07 0 0 4.96 4.96 3.17 9.72 0.15
> describe(f1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 0.17 0.48 0 0.05 0 0 2 2 2.78 6.93 0.07
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = SPZ PROGRESIVOS TOTAL CONGELADO
> VR1<-DATOS1$P_Total_motility_cong
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(VR1 ~ P_Total_motility_24H + DILUTOR + REPET%in%DILUTOR + RAZA +
DILUTOR*RAZA, data=DATOS1)
> #
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: VR1
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
P_Total_motility_24H 1 0.121 0.12057 0.2370 0.6272
DILUTOR              2 1.467 0.73357 1.4421 0.2402
RAZA                 2 0.186 0.09280 0.1824 0.8334
DILUTOR:REPET        6 2.461 0.41013 0.8063 0.5668
DILUTOR:RAZA         4 1.839 0.45979 0.9039 0.4639
Residuals           128 65.109 0.50867
> ##
> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
NOTE: A nesting structure was detected in the fitted model:
      REPET %in% DILUTOR
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
DILUTOR emmean SE df lower.CL upper.CL
AndroMed 0.343 0.107 128 0.1311 0.554
OptiXcell 0.194 0.125 128 -0.0534 0.442
TRIS-Yema 0.110 0.113 128 -0.1138 0.333

Results are averaged over the levels of: REPET, RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
contrast estimate SE df t.ratio p.value
AndroMed - OptiXcell 0.1483 0.176 128 0.842 0.6776
AndroMed - (TRIS-Yema) 0.2331 0.147 128 1.583 0.2566
OptiXcell - (TRIS-Yema) 0.0847 0.187 128 0.454 0.8928

Results are averaged over the levels of: REPET, RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
RAZA emmean SE df lower.CL upper.CL
BAYO 0.183 0.0978 128 -0.0106 0.376
BLANCO 0.197 0.1069 128 -0.0141 0.409
RUANO 0.267 0.1064 128 0.0560 0.477

Results are averaged over the levels of: REPET, DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
contrast estimate SE df t.ratio p.value
BAYO - BLANCO -0.0144 0.146 128 -0.099 0.9946
BAYO - RUANO -0.0836 0.145 128 -0.577 0.8325
BLANCO - RUANO -0.0692 0.151 128 -0.459 0.8903

Results are averaged over the levels of: REPET, DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")

```

Anexo 15. Análisis de varianza para el porcentaje de espermatozoides ViCA en muestras espermáticas criopreservadas en LN2

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA/TIPOS")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSAC_CONG.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$P_ViCA
> b<-blanco$P_ViCA
> c<-bayo$P_ViCA
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$ViCA
> bl<-blanco$ViCA
> cl<-bayo$ViCA
> #en dilutor
> d<-Tris$P_ViCA
> e<-OptiXcell$P_ViCA
> f<-Andromed$P_ViCA
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$ViCA
> el<-OptiXcell$ViCA
> fl<-Andromed$ViCA
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 0.22 0.35      0   0.18  0  0 0.97  0.97 1.08   -0.43 0.09
> describe(al)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 0.47 0.74      0   0.38  0  0  2   2 1.08   -0.43 0.19
> describe(b)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 1.37 1.66   0.49   1.18 0.7  0 5.24  5.24 1.18   -0.09 0.43
> describe(bl)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 15 2.87 3.46      1   2.46 1.48  0 11   11 1.17   -0.1 0.89
> describe(c)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 18 0.3 0.73      0   0.15  0  0  3   3 2.85    7.67 0.17
> describe(cl)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 18 0.61 1.46      0   0.31  0  0  6   6 2.79    7.36 0.34
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 0.45 0.78      0   0.3  0  0  3   3 2.15    4.36 0.19
> describe(dl)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 0.94 1.57      0   0.64  0  0  6   6 2.04    3.88 0.39
> describe(e)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 1.05 1.64   0.48   0.82 0.71  0 5.24  5.24 1.55    0.92 0.41
> describe(el)
  vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
```

```

X1      1 16 2.19 3.41      1      1.71 1.48  0 11      11 1.55      0.95 0.85
> describe(f)
vars  n mean  sd median trimmed mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 16 0.33 0.72      0      0.17  0  0 2.82  2.82 2.53      5.84 0.18
> describe(f1)
vars  n mean  sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16 0.69 1.54      0      0.36  0  0  6      6 2.56      5.98 0.38
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = VIVOS CON ACROSOMA
> VR1<-DATOS1$P_ViCA
> #
> # ANALISIS DE VARIANZA (covarianza, incluyendo como covariable al peso vivo)
> #
> MODELO1 <- lm(P_ViCA ~ P_ViCA_24h + DILUTOR + RAZA, data=DATOS1)
> #
> anova(MODELO1)
Analysis of Variance Table

Response: P_ViCA
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
P_ViCA_24h  1  0.110   0.1096   0.1059 0.746458
DILUTOR      2  5.555   2.7777   2.6840 0.079989 .
RAZA         2 12.878   6.4390   6.2219 0.004299 **
Residuals   42 43.466   1.0349
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> ##
> #COMPARACION DE MEDIAS funcion LSMEANS USANDO PAQUETE EMMEANS
> #
> # ELABORACION DE GRILLA
> VR.rg = ref_grid(MODELO1)
> #
> # COMPARACION ENTRE DILUTOR
> VR.RG.EMM.TRAT = emmeans(VR.rg,"DILUTOR")
> summary(VR.RG.EMM.TRAT)
DILUTOR      emmean      SE df lower.CL upper.CL
Andromed      0.365 0.255 42   -0.150   0.880
OptiXcell      1.160 0.269 42    0.617   1.702
Tris - Yema    0.325 0.292 42   -0.263   0.914

Results are averaged over the levels of: RAZA
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.TRAT,"pairwise")
contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
Andromed - OptiXcell    -0.7947 0.366 42   -2.170  0.0883
Andromed - (Tris - Yema)  0.0401 0.394 42    0.102  0.9943
OptiXcell - (Tris - Yema)  0.8347 0.426 42    1.959  0.1352

Results are averaged over the levels of: RAZA
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.TRAT, col="blue")
> #
> # COMPARACION ENTRE RAZAS
> VR.RG.EMM.RAZA = emmeans(VR.rg,"RAZA")
> summary(VR.RG.EMM.RAZA)
RAZA      emmean      SE df lower.CL upper.CL
BAYO      0.499 0.307 42   -0.120   1.119
BLANCO     1.332 0.265 42    0.797   1.867
RUANO      0.019 0.327 42   -0.640   0.678

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
Confidence level used: 0.95
> contrast(VR.RG.EMM.RAZA,"pairwise")
contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
BAYO - BLANCO    -0.832 0.422 42   -1.970  0.1322
BAYO - RUANO      0.481 0.525 42    0.915  0.6337
BLANCO - RUANO    1.313 0.404 42    3.252  0.0063

Results are averaged over the levels of: DILUTOR
P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
> plot(VR.RG.EMM.RAZA, col="blue")
> #

```

Anexo 16. Análisis de varianza para el porcentaje de vitalidad por efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2

VITALIDAD 0 HORAS – REFRIGERADAS 24 HORAS

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSM_LONG_TESIS.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h0 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "0 horas")
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$Porc_Vit
> b<-blanco$Porc_Vit
> c<-bayo$Porc_Vit
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$viv
> bl<-blanco$viv
> cl<-bayo$viv
> #en dilutor
> d<-Tris$Porc_Vit
> e<-OptiXcell$Porc_Vit
> f<-Andromed$Porc_Vit
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$viv
> el<-OptiXcell$viv
> fl<-Andromed$viv
> #en tiempo
> g<-h0$Porc_Vit
> h<-h24$Porc_Vit
> #para determinar el numero de datos
> gl<-h0$viv
> hl<-h24$viv
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 30 46.25 11.63  50.82  47.52 5.42 21.68 60.66 38.98 -0.99  -0.39 2.12
> describe(al)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 30 99.8 28.48   107 100.67 20.76 47 165  118 -0.32  -0.28 5.2
> describe(b)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 30 46.3 11.06  47.36  47.32 10.81 23.47 63.68 40.2 -0.66  -0.46 2.02
> describe(bl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 30 103.43 27.96   104 103.33 17.79 50 167  117 -0.01  -0.21 5.11
> describe(c)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 36 55.41 7.53  55.02    55 6.31 42.57 77.46 34.89 0.59   0.29 1.26
> describe(cl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 36 123.44 23.33 120.5 121.03 19.27 86 203  117 1.21   1.94 3.89
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 32 48.33 11.84  49.09  48.86 6.68 21.68 77.46 55.78 -0.33   0.67 2.09
> describe(dl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 32 103.72 25.19 107.5 104.85 14.83 47 165  118 -0.36   0.56 4.45
> describe(e)
```

```

vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 32 53.51 9.64 55.63 54.76 5.97 29.5 67 37.5 -1.17 0.6 1.7
> describe(e1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 32 121.5 30.83 120 121.38 21.5 59 203 144 0.2 0.34 5.45
> describe(f)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 32 47.26 10.46 48.36 48.57 6.8 22.64 62.16 39.52 -1.16 0.65 1.85
> describe(f1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 32 104.19 25.69 104 105.88 17.79 48 149 101 -0.67 0.05 4.54
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR TIEMPO
> describe(g)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 52.24 11.48 53.45 53.18 8.15 23.5 77.46 53.96 -0.86 0.76 1.66
> describe(g1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 115.83 30.68 113 115.97 17.05 47 203 156 0.01 0.61 4.43
> describe(h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 47.16 9.81 48.27 48.43 7.85 21.68 59.51 37.83 -1.16 0.78 1.42
> describe(h1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 48 103.77 24.6 104 104.8 17.05 48 167 119 -0.4 0.57 3.55
#
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = VITALIDAD
> VR1<-DATOS1$Porc_Vit
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
TIEMPO      1      619    618.9     6.860 0.0103 *
DILUTOR      2      716    358.1     3.969 0.0223 *
RAZA        2     1879    939.3    10.411 8.57e-05 ***
Residuals   90     8120     90.2
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

$TIEMPO
              diff             lwr             upr             p adj
24 horas-0 horas -5.078342 -8.930338 -1.226346 0.0103436

$DILUTOR
              diff             lwr             upr             p adj
OptiXcell-Andromed  6.254210  0.5951118 11.9133080 0.0266270
Tris - Yema-Andromed 1.068998 -4.5900998 6.7280964 0.8944563
Tris - Yema-OptiXcell -5.185212 -10.8443096 0.4738865 0.0794991

$RAZA
              diff             lwr             upr             p adj
BLANCO-BAYO -9.11088196 -14.706748 -3.515016 0.0005775
RUANO-BAYO -9.16411567 -14.759982 -3.568250 0.0005335
RUANO-BLANCO -0.05323371 -5.897925  5.791458 0.9997403

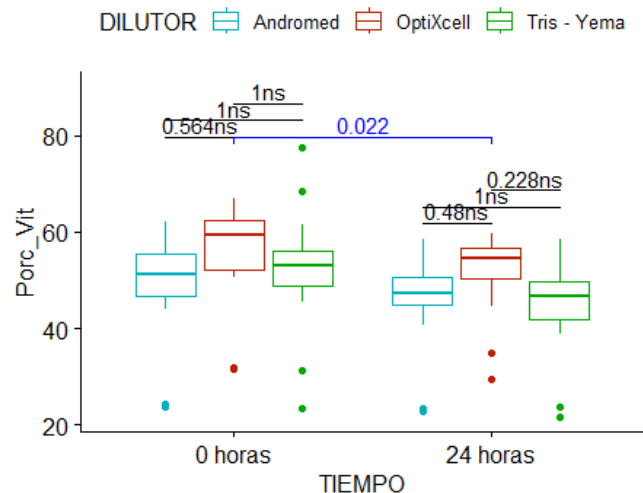
> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA
> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(Porc_Vit ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 × 11
  TIEMPO .y. group1 group2 n1 n2 statistic df p p.adj p.adj.signif
<fct> <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 0 horas Porc_Vit Andromed OptiXcell 16 16 -1.73 29.9 0.094 0.564 ns
2 0 horas Porc_Vit Andromed Tris - Yema 16 16 -0.785 29.4 0.439 1 ns
3 0 horas Porc_Vit OptiXcell Tris - Yema 16 16 0.797 29.0 0.432 1 ns
4 24 horas Porc_Vit Andromed OptiXcell 16 16 -1.81 29.3 0.08 0.48 ns
5 24 horas Porc_Vit Andromed Tris - Yema 16 16 0.326 30.0 0.746 1 ns
6 24 horas Porc_Vit OptiXcell Tris - Yema 16 16 2.17 29.4 0.038 0.228 ns
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)

```

```

> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "Porc_Vit",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-values SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> # ) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> # )
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> # )
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(Porc_Vit ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 x 8
+   .y.      group1 group2      n1      n2 statistic      df      p
+   <chr>    <chr>   <chr>    <int> <int>    <dbl> <dbl> <dbl>
1 Porc_Vit 0 horas 24 horas     48    48     2.33  91.8 0.022
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```



VITALIDAD REFRIGERADAS 24 HORAS - POST DESCONGELACIÓN

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/datos medidad repetidas 2-1-23")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('data_tesis_24_cong.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #RAZAS POR TIEMPO
> ruano24<-subset(ruano, TIEMPO == "24 horas")
> ruanoPC<-subset(ruano, TIEMPO == "pos congelado")
> blanco24<-subset(blanco, TIEMPO == "24 horas")
> blancoPC<-subset(blanco, TIEMPO == "pos congelado")
> bayo24<-subset(bayo, TIEMPO == "24 horas")
> bayoPC<-subset(bayo, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> # dilutor a cada tiempo
> Tris24<-subset(Tris, TIEMPO == "24 horas")
> TrisPC<-subset(Tris, TIEMPO == "pos congelado")
> OptiXcell24<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "24 horas")
> OptiXcellPC<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "pos congelado")
> Andromed24<-subset(Andromed, TIEMPO == "24 horas")
> AndromedPC<-subset(Andromed, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> hPC <- subset(DATOS1, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> #a<-ruano$P_ViSA
> #b<-blanco$P_ViSA
> #c<-bayo$P_ViSA
> #en razas dentro de las horas consideradas
> a_24h<-ruano24$Porc_Vit
> a_PC<-ruanoPC$Porc_Vit
> b_24h<-blanco24$Porc_Vit
> b_PC<-blancoPC$Porc_Vit
> c_24h<-bayo24$Porc_Vit
> c_PC<-bayoPC$Porc_Vit
> #
> # para determinar el numero de datos
> #a1<-ruano$ViCA
> #b1<-blanco$ViCA
> #c1<-bayo$ViCA
> #
> a1_24h<-ruano24$viv
> a1_PC<-ruanoPC$viv
> b1_24h<-blanco24$viv
> b1_PC<-blancoPC$viv
> c1_24h<-bayo24$viv
> c1_PC<-bayoPC$viv
> #
> #en dilutor
> #d<-Tris$P_ViSA
> #e<-OptiXcell$P_ViSA
> #f<-Andromed$PP_ViSA
> #
> #en dlutores dentro las horas
> d_24h<-Tris24$Porc_Vit
> d_PC<-TrisPC$Porc_Vit
> e_24h<-OptiXcell24$Porc_Vit
> e_PC<-OptiXcellPC$Porc_Vit
> f_24h<-Andromed24$Porc_Vit
> f_PC<-AndromedPC$Porc_Vit
> #
> #para determinar el numero de datos
> #d1<-Tris$ViSA
> #e1<-OptiXcell$ViSA
> #f1<-Andromed$ViSA
```

```

> #
> dl_24h<-Tris24$viv
> dl_PC<-TrisPC$viv
> el_24h<-OptiXcell124$viv
> el_PC<-OptiXcellPC$viv
> fl_24h<-Andromed24$viv
> fl_PC<-AndromedPC$viv
> #en tiempo
> #g<-h24$P_ViSA
> #h<-hPC$P_ViSA
> #para determinar el numero de datos
> #g1<-h24$ViSA
> #h1<-hPC$ViSA

> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA EN CADA HORA
> #
> describe(a_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 44.61 11.62 48.64 45.28 7.1 21.68 58.82 37.14 -0.87 -0.7 3
> describe(al_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 97.07 27.64 104 97.62 26.69 48 139 91 -0.48 -0.92 7.14
> describe(a_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 2.47 2.6 1.9 2.08 1.38 0 10 10 1.63 2.11 0.67
> describe(al_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 5.27 5.32 4 4.54 2.97 0 20 20 1.44 1.4 1.37
> describe(b_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 43.96 10.12 45.53 44.57 5.25 23.47 56.56 33.09 -0.81 -0.34 2.61
> describe(bl_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 100.87 29.44 103 99.69 11.86 50 167 117 0.2 -0.01 7.6
> describe(b_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 2.51 1.46 1.83 2.45 1.56 0.47 5.34 4.87 0.36 -1.29 0.38
> describe(bl_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 15 5.27 3.15 4 5.15 2.97 1 11 10 0.47 -1.34 0.81
> describe(c_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 18 51.95 5.62 51.82 52.06 7.01 42.57 59.51 16.94 -0.16 -1.56 1.32
> describe(cl_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 18 111.78 14.66 114 111.31 17.05 86 145 59 0.29 -0.55 3.45
> describe(c_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 18 1.85 1.65 1.64 1.75 1.82 0 5.31 5.31 0.51 -0.96 0.39
> describe(cl_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 18 3.83 3.37 3.5 3.62 3.71 0 11 11 0.5 -0.93 0.79
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR EN CADA HORA
> #
> describe(d_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 44.41 9.88 46.7 45.03 6.35 21.68 58.45 36.77 -1.07 0.36 2.47
> describe(dl_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 94.81 20.37 100 95.71 11.12 49 128 79 -0.91 0.23 5.09
> describe(d_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 3.57 2.27 3.26 3.27 1.9 1.29 10 8.71 1.29 1.39 0.57
> describe(dl_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 7.56 4.6 7 7 4.45 3 20 17 1.09 0.73 1.15
> describe(e_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 51.51 8.58 54.44 52.51 4.03 29.5 59.51 30.01 -1.39 0.78 2.14
> describe(el_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 115.19 25 116.5 115.5 14.83 59 167 108 -0.35 0.36 6.25
> describe(e_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 1.54 1.4 1.41 1.5 2.09 0 3.67 3.67 0.19 -1.65 0.35
> describe(el_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 3.12 2.87 3 3 4.45 0 8 8 0.33 -1.37 0.72
> describe(f_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 45.56 9.98 47.29 46.27 5.12 22.64 58.45 35.81 -1.16 0.56 2.49
> describe(fl_24h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 101.31 25 103 102 10.38 48 145 97 -0.69 0.14 6.25
> describe(f_PC)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 16 1.65 1.34 1.33 1.5 1.04 0 5.34 5.34 1.21 1.09 0.33

```

```

> describe(fl_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1    1 16  3.5 2.78      3    3.21 2.22  0  11   11 1.12    0.81 0.7
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = REACCION HOST POSITIVA
> VR1<-DATOS1$Porc_Vit
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)
      Df Sum Sq Mean Sq  F value Pr(>F)
TIEMPO    1  48403   48403 1022.757 <2e-16 ***
DILUTOR    2    162     81   1.709 0.1869
RAZA       2    279    140   2.948 0.0575 .
Residuals  90   4259     47
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary.lm(MODELO1)

Call:
aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-23.5981 -2.3903  0.9452  3.6344 11.0025

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    48.2521     1.6714  28.870 <2e-16 ***
TIEMPOpos congelado -44.9085     1.4042 -31.981 <2e-16 ***
DILUTOROptiXcell    2.9263     1.7198   1.701 0.0923 .
DILUTORTris - Yema  0.3869     1.7198   0.225 0.8225
RAZABLANCO      -3.6652     1.7006  -2.155 0.0338 *
RAZARUANO       -3.3609     1.7006  -1.976 0.0512 .
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 6.879 on 90 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9198, Adjusted R-squared:  0.9153
F-statistic: 206.4 on 5 and 90 DF, p-value: < 2.2e-16

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

$TIEMPO
              diff             lwr             upr p adj
pos congelado-24 horas -44.90854 -47.69832 -42.11876    0

$DILUTOR
              diff             lwr             upr      p adj
OptiXcell-Andromed    2.926250 -1.172307 7.024807 0.2102486
Tris - Yema-Andromed  0.386875 -3.711682 4.485432 0.9724988
Tris - Yema-OptiXcell -2.539375 -6.637932 1.559182 0.3069839

$RAZA
              diff             lwr             upr      p adj
BLANCO-BAYO  -3.6652222 -7.717984 0.3875392 0.0846681
RUANO-BAYO   -3.3608889 -7.413650 0.6918726 0.1239820
RUANO-BLANCO 0.3043333 -3.928638 4.5373046 0.9839495

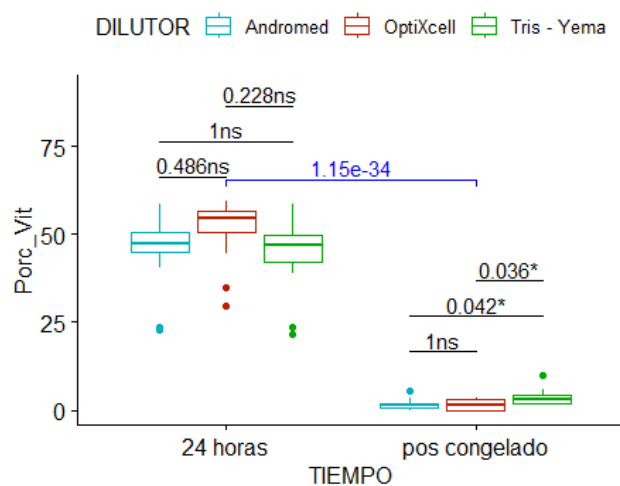
> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA
> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(Porc_Vit ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 x 11
  TIEMPO      .y. group1 group2      n1      n2 statistic      df      p p.adj p.adj.signif
  <fct>    <chr> <chr> <chr>    <int> <int>    <dbl>    <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 24 horas Porc_Vit Andromed OptiXcell    16     16    -1.81    29.3 0.081 0.486 ns
2 24 horas Porc_Vit Andromed Tris - Yema    16     16     0.327    30.0 0.746 1 ns
3 24 horas Porc_Vit OptiXcell Tris - Yema    16     16     2.17    29.4 0.038 0.228 ns
4 pos congelado Porc_Vit Andromed OptiXcell    16     16     0.208    29.9 0.837 1 ns
5 pos congelado Porc_Vit Andromed Tris - Yema    16     16    -2.92    24.3 0.007 0.042 *
6 pos congelado Porc_Vit OptiXcell Tris - Yema    16     16    -3.03    24.9 0.006 0.036 *
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)

```

```

> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "Porc_Vit",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-values SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> # ) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> # )
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> # )
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(Porc_Vit ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 × 8
+   .y.      group1      group2      n1      n2 statistic      df      p
+   <chr>   <chr>      <chr>      <int> <int>      <dbl> <dbl>   <dbl>
1 Porc_Vit 24 horas pos congelado    48    48    31.1   50.6 1.15e-34
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```



Anexo 17. Análisis de varianza para el porcentaje espermatozoides con reacción HOS Positiva, considerando el efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2

HOS TEST 0 HORAS - REFRIGERADAS 24 HORAS

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSM_LONG_TESIS.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h0 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "0 horas")
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$Porc_REACT
> b<-blanco$Porc_REACT
> c<-bayo$Porc_REACT
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$reac
> bl<-blanco$reac
> cl<-bayo$reac
> #en dilutor
> d<-Tris$Porc_REACT
> e<-OptiXcell$Porc_REACT
> f<-Andromed$Porc_REACT
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$reac
> el<-OptiXcell$reac
> fl<-Andromed$reac
> #en tiempo
> g<-h0$Porc_REACT
> h<-h24$Porc_REACT
> #para determinar el numero de datos
> gl<-h0$reac
> hl<-h24$reac
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 30 29.13 14.43  26.29   27.9 12.44  7.5  64.49 56.99 0.77   -0.08 2.63
> describe(al)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 30 63.3 34   54.5   59.92 29.65  15 158   143 0.98    0.5 6.21
> describe(b)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 30 23.31 7.88  22.79   23.03 9.47 11.71 39.51 27.8 0.25   -1.24 1.44
> describe(bl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 30 48.9 16.86   49   48.38 20.76  24  81    57 0.21   -1.28 3.08
> describe(c)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 36 22.95 10.78  20.39   21.29 6.97  8.42 54.37 45.95 1.53    1.89 1.8
> describe(cl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 36 48.14 22.94   42   44.87 14.08  17 112    95 1.45    1.64 3.82
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 32 21.6 11.41  18.39   19.91 8.44  7.5 54.37 46.87 1.25    0.97 2.02
> describe(dl)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 32 44.69 24.01  37.5    41 17.05  15 112    97 1.28    1.01 4.24
```

```

> describe(e)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 27.58 12.4 23.77 25.39 6.75 14.63 64.49 49.86 1.61 2.06 2.19
> describe(e1)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 60 29.76 49 54.62 12.6 30 158 128 1.79 2.83 5.26
> describe(f)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 25.8 10.23 22.71 24.86 10.36 12.5 52.36 39.86 0.7 -0.33 1.81
> describe(f1)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 54.66 22.39 49.5 52.81 21.5 23 111 88 0.66 -0.4 3.96
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR TIEMPO
> describe(g)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 28.69 13.26 25.89 27.28 9.66 10.14 64.49 54.34 0.98 0.22 1.91
> describe(g1)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 60.96 30.09 54 57.5 22.98 21 158 137 1.23 1.24 4.34
> describe(h)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 21.3 8.1 19.47 20.74 7.3 7.5 42.15 34.65 0.66 -0.13 1.17
> describe(h1)
  vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 45.27 18.61 41.5 43.6 14.83 15 94 79 0.86 0.3 2.69
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = reactivos HOST
> VR1<-DATOS1$Porc_REACT
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODEL01=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TIEMPO    1 1310 1309.7 11.795 0.0009 ***
DILUTOR    2 603 301.6 2.716 0.0715 .
RAZA       2 749 374.3 3.371 0.0387 *
Residuals 90 9993 111.0
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> summary.lm(MODELO1)

Call:
aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-19.677  -6.834  -2.793   5.292  31.116

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    27.4521     2.5601  10.723 <2e-16 ***
TIEMPO24 horas  -7.3871     2.1509  -3.434 0.0009 ***
DILUTOROptiXcell 1.7802     2.6344   0.676 0.5009
DILUTORTris - Yema -4.1991     2.6344  -1.594 0.1144
RAZABLANCO      0.3573     2.6049   0.137 0.8912
RAZARUANO       6.1787     2.6049   2.372 0.0198 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 10.54 on 90 degrees of freedom
Multiple R-squared: 0.2103, Adjusted R-squared: 0.1664
F-statistic: 4.794 on 5 and 90 DF, p-value: 0.0006248

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

$TIEMPO
      diff      lwr      upr      p adj
24 horas-0 horas -7.387109 -11.66034 -3.113873 0.0009001

$DILUTOR
      diff      lwr      upr      p adj
OptiXcell-Andromed 1.780153 -4.497803 8.0581091 0.7781727
Tris - Yema-Andromed -4.199128 -10.477084 2.0788277 0.2534864
Tris - Yema-OptiXcell -5.979281 -12.257237 0.2986748 0.0653474

$RAZA
      diff      lwr      upr      p adj
BLANCO-BAYO 0.3572888 -5.85052030 6.565098 0.9896833
RUANO-BAYO 6.1787466 -0.02906259 12.386556 0.0513597
RUANO-BLANCO 5.8214577 -0.66238748 12.305303 0.0876262

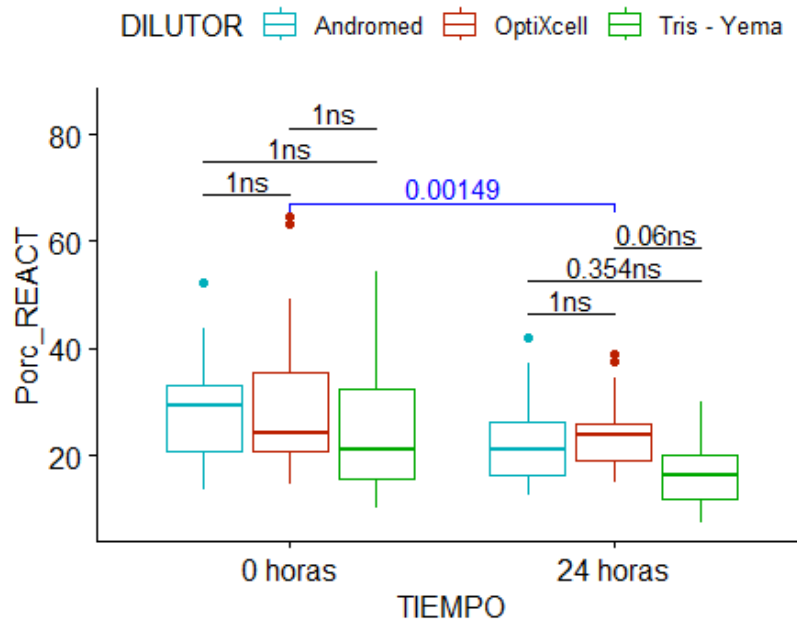
> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA

```

```

> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(Porc_REACT ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 × 11
  TIEMPO   .y.      group1      group2      n1      n2 statistic      df      p p.adj p.adj.signif
  <fct>   <chr>      <chr>      <chr>      <int> <int>      <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 0 horas Porc_REACT Andromed OptiXcell    16    16   -0.433   27.1 0.669 1      ns
2 0 horas Porc_REACT Andromed Tris - Yema    16    16    0.680   28.9 0.502 1      ns
3 0 horas Porc_REACT OptiXcell Tris - Yema    16    16    0.978   29.4 0.336 1      ns
4 24 horas Porc_REACT Andromed OptiXcell    16    16   -0.534   29.3 0.597 1      ns
5 24 horas Porc_REACT Andromed Tris - Yema    16    16    1.97    28.8 0.059 0.354 ns
6 24 horas Porc_REACT OptiXcell Tris - Yema    16    16    2.75    29.9 0.01  0.06  ns
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "Porc_REACT",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-values SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> # ) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> # )
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> # )
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(Porc_REACT ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 × 8
  .y.      group1      group2      n1      n2 statistic      df      p
  <chr>   <chr>      <chr>      <int> <int>      <dbl> <dbl> <dbl>
1 Porc_REACT 0 horas 24 horas    48    48    3.29   77.8 0.00149
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex

```



HOS TEST
REFRIGERADAS 24 HORAS - POST DESCONGELACIÓN

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/datos medidad repetidas 2-1-23")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('data_tesis_24_cong.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #RAZAS POR TIEMPO
> ruano24<-subset(ruano, TIEMPO == "24 horas")
> ruanoPC<-subset(ruano, TIEMPO == "pos congelado")
> blanco24<-subset(blanco, TIEMPO == "24 horas")
> blancoPC<-subset(blanco, TIEMPO == "pos congelado")
> bayo24<-subset(bayo, TIEMPO == "24 horas")
> bayoPC<-subset(bayo, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> # dilutor a cada tiempo
> Tris24<-subset(Tris, TIEMPO == "24 horas")
> TrisPC<-subset(Tris, TIEMPO == "pos congelado")
> OptiXcell24<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "24 horas")
> OptiXcellPC<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "pos congelado")
> Andromed24<-subset(Andromed, TIEMPO == "24 horas")
> AndromedPC<-subset(Andromed, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> hPC <- subset(DATOS1, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> #a<-ruano$P_VISA
> #b<-blanco$P_VISA
> #c<-bayo$P_VISA
> #en razas dentro de las horas consideradas
> a_24h<-ruano24$Porc_REACT
```

```

> a_PC<-ruanoPC$Porc_REACT
> b_24h<-blanco24$Porc_REACT
> b_PC<-blancoPC$Porc_REACT
> c_24h<-bayo24$Porc_REACT
> c_PC<-bayoPC$Porc_REACT
> #
> # para determinar el numero de datos
> #a1<-ruano$ViCA
> #b1<-blanco$ViCA
> #c1<-bayo$ViCA
> #
> a1_24h<-ruano24$reac
> a1_PC<-ruanoPC$reac
> b1_24h<-blanco24$reac
> b1_PC<-blancoPC$reac
> c1_24h<-bayo24$reac
> c1_PC<-bayoPC$reac
> #
> #en dilutor
> #d<-Tris$P_ViSA
> #e<-OptiXcell$P_ViSA
> #f<-Andromed$PP_ViSA
> #
> #en dlutores dentro las horas
> d_24h<-Tris24$Porc_REACT
> d_PC<-TrisPC$Porc_REACT
> e_24h<-OptiXcell24$Porc_REACT
> e_PC<-OptiXcellPC$Porc_REACT
> f_24h<-Andromed24$Porc_REACT
> f_PC<-AndromedPC$Porc_REACT
> #
> #para determinar el numero de datos
> #d1<-Tris$ViSA
> #e1<-OptiXcell$ViSA
> #f1<-Andromed$ViSA
> #
> d1_24h<-Tris24$reac
> d1_PC<-TrisPC$reac
> e1_24h<-OptiXcell24$reac
> e1_PC<-OptiXcellPC$reac
> f1_24h<-Andromed24$reac
> f1_PC<-AndromedPC$reac
> #en tiempo
> #g<-h24$P_ViSA
> #h<-hPC$P_ViSA
> #para determinar el numero de datos
> #g1<-h24$ViSA
> #h1<-hPC$ViSA
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA EN CADA HORA
> #
> describe(a_24h)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 15 25.17 9.66  23.65   25.22 6.63 7.5 42.15 34.65 0.06   -0.98 2.5
> describe(a1_24h)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 15 54.53 23.3   48   54.54 16.31 15 94   79 0.29   -1.03 6.01
> describe(a_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 15 2.55 2.28  2.28   2.29 1.01 0.44 7.91  7.47 1.37    0.76 0.59
> describe(a1_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 15 5.4 5.04   5   4.85 1.48  1 17   16 1.45    0.89 1.3
> describe(b_24h)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 15 19.05 5.29 17.39   18.88 7.25 11.71 28.57 16.86 0.23   -1.42 1.36
> describe(b1_24h)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 15 39.93 11.55   36   39.77 16.31 24 58   34 0.11   -1.61 2.98
> describe(b_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 15 1.3 0.79  0.97   1.28 0.59  0 2.88  2.88 0.51   -0.78 0.2
> describe(b1_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 15 2.73 1.62   2   2.69 1.48  0 6    6 0.5   -0.74 0.42
> describe(c_24h)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 18 19.96 7.85 17.94   19.5 4.56 8.42 38.86 30.44 0.76   -0.2 1.85
> describe(c1_24h)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 18 42 16.98 37.5   41.06 9.64 17 82   65 0.77   -0.23 4
> describe(c_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 18 1.52 1.17  1.36   1.41 0.67  0 4.81  4.81 1.26    1.19 0.28
> describe(c1_PC)
  vars  n mean  sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 18 3.17 2.41   3   2.94 1.48  0 10   10 1.27    1.29 0.57
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR EN CADA HORA

```

```

> #
> describe(d_24h)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 16 17.16 6.98 16.42 16.94 6.69 7.5 29.85 22.35 0.46 -1.01 1.75
> describe(dl_24h)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 16 35.12 14.38    33 34.79 12.6 15 60 45 0.45 -1.04 3.6
> describe(d_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 16 1.8 1.75 0.99 1.52 0.65 0 7.56 7.56 2.11 4.45 0.44
> describe(dl_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 16 3.81 3.92    2 3.14 1.48 0 17 17 2.27 5.11 0.98
> describe(e_24h)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 16 24.13 7.33 23.77 23.73 6.75 14.9 38.86 23.96 0.71 -0.72 1.83
> describe(el_24h)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 16 52.25 18.47 48.5 51 11.86 31 91 60 0.97 -0.43 4.62
> describe(e_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 16 2.26 1.86 1.64 1.99 1.16 0.44 7.91 7.47 1.73 2.66 0.47
> describe(el_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 16 4.75 3.97 3.5 4.14 2.22 1 17 16 1.81 2.97 0.99
> describe(f_24h)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 16 22.62 8.61 20.99 21.94 7.21 12.5 42.15 29.65 0.83 -0.44 2.15
> describe(fl_24h)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 16 48.44 19.1 44.5 46.86 15.57 25 94 69 0.84 -0.24 4.77
> describe(f_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1     1 16 1.25 0.9 0.94 1.19 0.71 0 3.37 3.37 0.73 -0.38 0.23
> describe(fl_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed  mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 16 2.62 1.82    2 2.5 1.48 0 7 7 0.71 -0.24 0.46
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = REACCION HOST POSITIVA
> VR1<-DATOS1$Porc_REACT
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
TIEMPO        1  9155    9155 301.874 <2e-16 ***
DILUTOR        2   228     114   3.761 0.0270 *
RAZA           2   240     120   3.958 0.0225 *
Residuals     90  2729      30
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary.lm(MODELO1)

Call:
aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-14.0660  -3.0515  -0.5107   2.2900  18.1318

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    20.9017    1.3379   15.622 <2e-16 ***
TIEMPOpos congelado -19.5306    1.1241  -17.375 <2e-16 ***
DILUTOROptiXcell    1.2606    1.3767    0.916 0.3623
DILUTORTris - Yema  -2.4522    1.3767   -1.781 0.0783 .
RAZABLANCO       -0.5668    1.3613   -0.416 0.6781
RAZARUANO         3.1165    1.3613    2.289 0.0244 *
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 5.507 on 90 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.779, Adjusted R-squared:  0.7668
F-statistic: 63.46 on 5 and 90 DF, p-value: < 2.2e-16

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
  95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

$TIEMPO
              diff            lwr            upr p adj
pos congelado-24 horas -19.53063 -21.76384 -17.29741 0

$DILUTOR

```

```

              diff      lwr      upr      p adj
OptiXcell-Andromed    1.260625 -2.020262  4.5415117 0.6318589
Tris - Yema-Andromed -2.452187 -5.733074  0.8286992 0.1817137
Tris - Yema-OptiXcell -3.712813 -6.993699 -0.4319258 0.0225362

$RAZA
              diff      lwr      upr      p adj
BLANCO-BAYO  -0.5668333 -3.8110609  2.677394 0.9089667
RUANO-BAYO    3.1165000 -0.1277276  6.360728 0.0624486
RUANO-BLANCO  3.6833333  0.2948482  7.071819 0.0297950

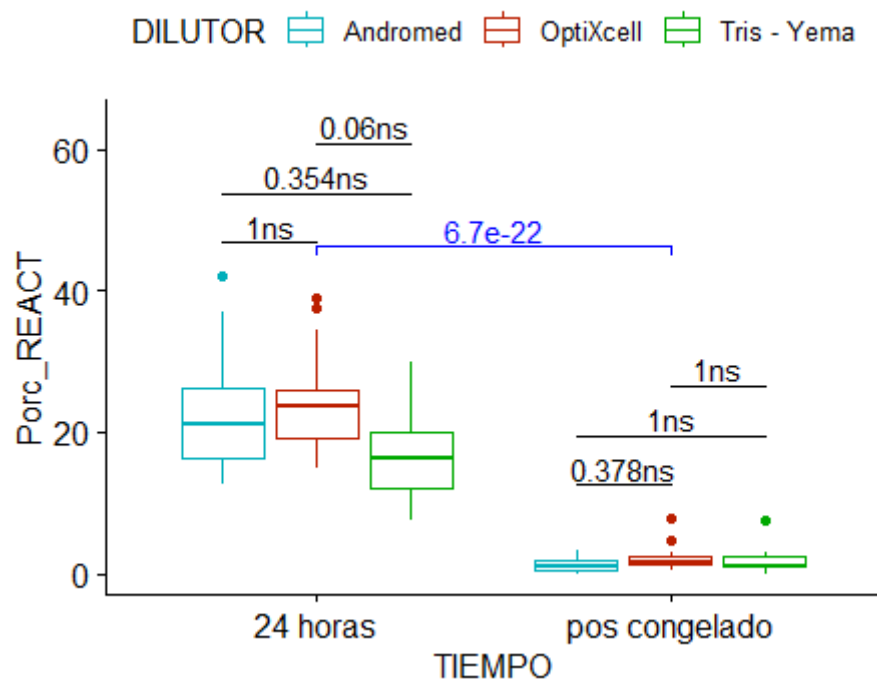
> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA
> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(Porc_REACT ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 × 11
  TIEMPO      .y.      group1      group2      n1      n2 statistic      df      p p.adj p.adj.signif
  <fct>      <chr>      <chr>      <chr>      <int> <int>      <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 24 horas   Porc_REACT Andromed   OptiXcell    16     16    -0.534   29.3 0.597 1      ns
2 24 horas   Porc_REACT Andromed   Tris - Yema    16     16     1.97   28.8 0.059 0.354 ns
3 24 horas   Porc_REACT OptiXcell   Tris - Yema    16     16     2.75   29.9 0.01  0.06  ns
4 pos congelado Porc_REACT Andromed   OptiXcell    16     16    -1.96   21.6 0.063 0.378 ns
5 pos congelado Porc_REACT Andromed   Tris - Yema    16     16    -1.13   22.4 0.272 1      ns
6 pos congelado Porc_REACT OptiXcell   Tris - Yema    16     16     0.717   29.9 0.479 1      ns
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "Porc_REACT",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-valores SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> #) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   remove.bracket = TRUE
> #)
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> #)
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(Porc_REACT ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 × 8
  .y.      group1      group2      n1      n2 statistic      df      p
  <chr>      <chr>      <chr>      <int> <int>      <dbl> <dbl> <dbl>
1 Porc_REACT 24 horas pos congelado    48     48     16.4   50.6 6.70e-22
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +

```

```

+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```



Anexo 18. Análisis de varianza para el porcentaje motilidad total, considerando el efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2

MOTILIDAD TOTAL 0 HORAS - REFRIGERADAS 24 HORAS

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/datos medidad repetidas 2-1-23")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('data_motilidad_0_24h.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> DATOS1$REPET<-as.factor(DATOS1$REPET)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "TRIS-Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "AndroMed")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h0 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "0 horas")
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$P_Total_motility
> b<-blanco$P_Total_motility
> c<-bayo$P_Total_motility
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$Total_motility
> bl<-blanco$Total_motility
> cl<-bayo$Total_motility
> #en dilutor
> d<-Tris$P_Total_motility
> e<-OptiXcell$P_Total_motility
> f<-Andromed$P_Total_motility
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$Total_motility
> el<-OptiXcell$Total_motility
> fl<-Andromed$Total_motility
> #en tiempo
> g<-h0$P_Total_motility
> h<-h24$P_Total_motility
> #para determinar el numero de datos
> gl<-h0$Total_motility
> hl<-h24$Total_motility
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1  90 35.43 12.13  31.87  34.25 11.45 14.97 67.23 52.26 0.81    0.13 1.28
> describe(al)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1  90 245.84 134.69   207  233.21 123.8  39 643   604 0.81   -0.02 14.2
> describe(b)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1  90 34.93 13.26  33.84  34.33 12.43  9.52 67.5 57.98 0.44   -0.36 1.4
> describe(bl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1  90 257.47 222.49   175  221.74 143.81  26 1105 1079 1.44    1.66 23.45
> describe(c)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 108 38.4 11.37  35.63  38.22 10.63  8.8 61.37 52.57 0.12   -0.45 1.09
> describe(cl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1 108 357.96 241.98   302  326.58 192.74  30 1457 1427 1.69    3.94 23.28
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1    1  96 30.35  8.55  30.45  30.62  8.4  8.8 48.72 39.92 -0.2   -0.09 0.87
> describe(dl)
  vars  n  mean    sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
```

```

X1      1 96 264.59 146.19 253.5 255.9 139.36 26 607 581 0.5 -0.43 14.92
> describe(e)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 96 46.04 11.2 46.33 45.99 14.22 21.93 67.5 45.57 0.02 -0.93 1.14
> describe(e1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 96 386.39 269.71 333.5 349.47 247.59 41 1457 1416 1.36 2.16 27.53
> describe(f)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 96 32.76 10.64 31.02 32.19 9.03 9.95 63 53.05 0.56 0.02 1.09
> describe(f1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 96 223.58 169.73 178 192.47 99.33 26 763 737 1.65 2.17 17.32
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR TIEMPO
> describe(g)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 144 40.35 13.06 39.5 39.88 14.71 16.41 67.5 51.09 0.26 -0.96 1.09
> describe(g1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 144 365.8 250.06 303 334.62 220.91 41 1457 1416 1.35 2.33 20.84
> describe(h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 144 32.42 10.04 31.74 32.42 7.67 8.8 61.34 52.54 0.11 0.05 0.84
> describe(h1)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 144 217.24 132.86 185 204.9 118.61 26 633 607 0.94 0.7 11.07
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = PROGRESIVOS RAPIDOS
> VR1<-DATOS1$P_Total_motility
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA + REPET %in% DILUTOR, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TIEMPO	1	4535	4535	52.446	4.42e-12 ***
DILUTOR	2	13706	6853	79.252	< 2e-16 ***
RAZA	2	711	356	4.113	0.0174 *
DILUTOR:REPET	6	495	83	0.955	0.4564
Residuals	276	23865	86		

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary.lm(MODELO1)

Call:
aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA + REPET %in% DILUTOR,
     data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-27.189  -6.564   1.073   5.707  25.296

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    41.1738    1.8716   22.000 < 2e-16 ***
TIEMPO24 horas  -7.9363    1.0959  -7.242 4.42e-12 ***
DILUTOROptiXcell 11.6231    2.3247   5.000 1.02e-06 ***
DILUTORTRIS-Yema -4.2850    2.3247  -1.843 0.06637 .
RAZABLANCO      -3.4700    1.3272  -2.615 0.00943 **
RAZARUANO       -2.9712    1.3272  -2.239 0.02597 *
DILUTORAndroMed:REPETB -3.8125    2.3247  -1.640 0.10215
DILUTOROptiXcell:REPETB -0.2081    2.3247  -0.090 0.92873
DILUTORTRIS-Yema:REPETB  0.4622    2.3247   0.199 0.84255
DILUTORAndroMed:REPETC -3.4772    2.3247  -1.496 0.13586
DILUTOROptiXcell:REPETC -2.1181    2.3247  -0.911 0.36302
DILUTORTRIS-Yema:REPETC -2.1350    2.3247  -0.918 0.35921
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 9.299 on 276 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.449,    Adjusted R-squared:  0.427
F-statistic: 20.45 on 11 and 276 DF,  p-value: < 2.2e-16

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
    Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA + REPET %in% DILUTOR, data = DATOS1)

$TIEMPO
              diff            lwr             upr p adj
24 horas-0 horas -7.936319 -10.09366 -5.778977      0

$DILUTOR
              diff            lwr             upr      p adj
OptiXcell-AndroMed 13.277604  10.11487  16.4403353 0.0000000
TRIS-Yema-AndroMed -2.412708  -5.57544   0.7500228 0.1722655

```

TRIS-Yema-OptiXcell -15.690312 -18.85304 -12.5275813 0.0000000

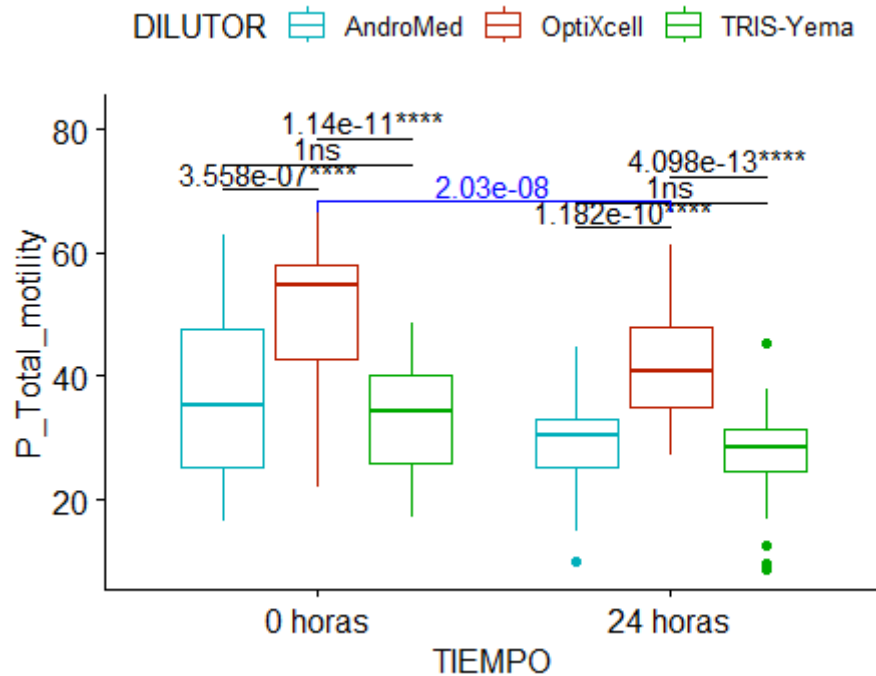
```
$RAZA
      diff      lwr      upr      p adj
BLANCO-BAYO -3.4699630 -6.597355 -0.3425707 0.0254565
RUANO-BAYO  -2.9711852 -6.098577  0.1562071 0.0665785
RUANO-BLANCO 0.4987778 -2.767677  3.7652325 0.9311429

> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA
> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(P_Total_motility ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 x 11
  TIEMPO   .y.      group1      group2      n1      n2 statistic      df      p      p.adj
p.adj.signif
<fct>    <chr>      <chr>      <chr>    <int> <int>      <dbl> <dbl>      <dbl>  <dbl> <chr>
1 0 horas P_Total_motility AndroMed OptiXc... 48 48      -5.89 94.0 5.93e- 8 3.56e- 7 ****
2 0 horas P_Total_motility AndroMed TRIS-Y... 48 48       1.33 81.8 1.89e- 1 1 e+ 0 ns
3 0 horas P_Total_motility OptiXcell TRIS-Y... 48 48       8.28 82.3 1.9 e-12 1.14e-11 ****
4 24 horas P_Total_motility AndroMed OptiXc... 48 48      -7.63 93.5 1.97e-11 1.18e-10 ****
5 24 horas P_Total_motility AndroMed TRIS-Y... 48 48       1.32 93.9 1.89e- 1 1 e+ 0 ns
6 24 horas P_Total_motility OptiXcell TRIS-Y... 48 48       8.79 93.8 6.83e-14 4.10e-13 ****
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "P_Total_motility",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-values SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> #) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> #)
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> #)
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(P_Total_motility ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 x 8
  .y.      group1 group2      n1      n2 statistic      df      p
* <chr>      <chr>  <chr>    <int> <int>      <dbl> <dbl>      <dbl>
1 P_Total_motility 0 horas 24 horas   144   144       5.78 268. 0.0000000203
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
```

```

+   step.increase = 0.1, color = "blue"
+ ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```



MOTILIDAD TOTAL
REFRIGERADAS 24 HORAS – POST DESCONGELACIÓN

```

> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/datos medidad repetidas 2-1-23")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('data_motilidad 24_cong.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> DATOS1$REPET<-as.factor(DATOS1$REPET)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #RAZAS POR TIEMPO
> ruano24<-subset(ruano, TIEMPO == "24 horas")
> ruanoPC<-subset(ruano, TIEMPO == "pos congelado")
> blanco24<-subset(blanco, TIEMPO == "24 horas")
> blancoPC<-subset(blanco, TIEMPO == "pos congelado")
> bayo24<-subset(bayo, TIEMPO == "24 horas")
> bayoPC<-subset(bayo, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "TRIS-Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "AndroMed")
> #
> # dilutor a cada tiempo
> Tris24<-subset(Tris, TIEMPO == "24 horas")

```

```

> TrisPC<-subset(Tris, TIEMPO == "pos congelado")
> OptiXcell124<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "24 horas")
> OptiXcellPC<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "pos congelado")
> Andromed24<-subset(Andromed, TIEMPO == "24 horas")
> AndromedPC<-subset(Andromed, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> hPC <- subset(DATOS1, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> #a<-ruano$P_Static
> #b<-blanco$P_Static
> #c<-bayo$P_Static
> #en razas dentro de las horas consideradas
> a_24h<-ruano24$P_Total_motility
> a_PC<-ruanoPC$P_Total_motility
> b_24h<-blanco24$P_Total_motility
> b_PC<-blancoPC$P_Total_motility
> c_24h<-bayo24$P_Total_motility
> c_PC<-bayoPC$P_Total_motility
> #
> # para determinar el numero de datos
> #a1<-ruano$Static
> #b1<-blanco$Static
> #c1<-bayo$Static
> #
> a1_24h<-ruano24$Total_motility
> a1_PC<-ruanoPC$Total_motility
> b1_24h<-blanco24$Total_motility
> b1_PC<-blancoPC$Total_motility
> c1_24h<-bayo24$Total_motility
> c1_PC<-bayoPC$Total_motility
> #
> #en dilutor
> #d<-Tris$P_Static
> #e<-OptiXcell$P_Static
> #f<-Andromed$P_Static
> #
> #en dlutores dentro las horas
> d_24h<-Tris24$P_Total_motility
> d_PC<-TrisPC$P_Total_motility
> e_24h<-OptiXcell124$P_Total_motility
> e_PC<-OptiXcellPC$P_Total_motility
> f_24h<-Andromed24$P_Total_motility
> f_PC<-AndromedPC$P_Total_motility
> #
> #para determinar el numero de datos
> #d1<-Tris$Static
> #e1<-OptiXcell$Static
> #f1<-Andromed$Static
> #
> d1_24h<-Tris24$Total_motility
> d1_PC<-TrisPC$Total_motility
> e1_24h<-OptiXcell124$Total_motility
> e1_PC<-OptiXcellPC$Total_motility
> f1_24h<-Andromed24$Total_motility
> f1_PC<-AndromedPC$Total_motility
> #en tiempo
> #g<-h24$P_Static
> #h<-hPC$P_Static
> #para determinar el numero de datos
> #g1<-h24$Static
> #h1<-hPC$Static
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA EN CADA HORA
> #
> describe(a_24h)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 31.97 8.49  30.43   31.91 5.97 14.97 48.72 33.75 0.25   -0.59 1.27
> describe(a1_24h)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 194.24 106.13   177   185.3 83.03 39 438   399 0.87   -0.28 15.82
> describe(a_PC)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 0.26 0.76      0    0.06  0  0 3.86   3.86 3.08    9.71 0.11
> describe(a1_PC)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 0.16 0.42      0    0.05  0  0  2     2 2.66    6.72 0.06
> describe(b_24h)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 31.11 10.81   32.7   31.19 9.58 9.52 55.23 45.71 -0.18   -0.54 1.61
> describe(b1_24h)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 173.11 105.51   175   165.73 131.95 26 463   437 0.5   -0.33 15.73
> describe(b_PC)
  vars  n  mean  sd median trimmed  mad min  max range skew kurtosis  se
X1      1 45 0.19 0.45      0    0.09  0  0 1.3    1.3 1.85    1.49 0.07

```

```

> describe(bl_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 45 0.16 0.37      0    0.08  0  0  1    1 1.84    1.41 0.05
> describe(c_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 54 33.88 10.54 32.62 33.72 6.88 8.8 61.34 52.54 0.28    0.15 1.43
> describe(cl_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 54 273.19 154.08 264 260.98 160.12 30 633 603 0.64   -0.21 20.97
> describe(c_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 54 0.19 0.83      0      0  0  0 4.96 4.96 4.48    20.27 0.11
> describe(cl_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 54 0.09 0.4      0      0  0  0 2    2 4.18   16.38 0.05
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR EN CADA HORA
> #
> describe(d_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 26.95 7.79 28.55 27.36 6.26 8.8 45.25 36.45 -0.53   -0.01 1.12
> describe(dl_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 229.23 125.57 219 227.7 152.71 26 492 466 0.05   -1.1 18.12
> describe(d_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 0.08 0.34      0      0  0  0 1.72 1.72 3.75   13.07 0.05
> describe(dl_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 0.06 0.24      0      0  0  0 1    1 3.5    10.49 0.04
> describe(e_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 41.26 8.15 40.77 41.18 10.22 27.13 61.34 34.21 0.14   -0.85 1.18
> describe(el_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 271.46 156.23 225.5 254.22 136.4 76 633 557 0.86   -0.31 22.55
> describe(e_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 0.22 0.58      0    0.09  0  0 2.84 2.84 2.7    7.22 0.08
> describe(el_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 0.17 0.43      0    0.07  0  0 2    2 2.48    5.71 0.06
> describe(f_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 29.03 7.56 30.43 29.21 5.6 9.95 44.65 34.7 -0.38   -0.03 1.09
> describe(fl_24h)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 151.04 76.84 146.5 149.1 91.18 26 324 298 0.14   -1.02 11.09
> describe(f_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 0.34 1.01      0    0.07  0  0 4.96 4.96 3.17    9.72 0.15
> describe(fl_PC)
  vars  n mean    sd median trimmed mad min max range skew kurtosis  se
X1     1 48 0.17 0.48      0    0.05  0  0 2    2 2.78    6.93 0.07
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = PROGRESIVOS TOTALES
> VR1<-DATOS1$P_Total_motility
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA + REPET %in% DILUTOR, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)
      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
TIEMPO      1 74666   74666 1825.256 < 2e-16 ***
DILUTOR      2  2888    1444  35.302 2.23e-14 ***
RAZA         2    99     50   1.212  0.299
DILUTOR:REPET 6   194     32   0.790  0.578
Residuals   276 11290     41
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> summary.lm(MODELO1)

Call:
lm(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA + REPET %in% DILUTOR,
    data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-20.8026  -4.1533   0.8065   2.9892  23.7081

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    33.2376    1.2873  25.820 < 2e-16 ***
TIEMPOPos congelado -32.2028    0.7538 -42.723 < 2e-16 ***
DILUTOROptiXcell    4.3944    1.5990   2.748  0.00639 **
DILUTORTRIS-Yema   -2.7412    1.5990  -1.714  0.08758 .
RAZABLANCO        -1.3834    0.9128  -1.516  0.13079
RAZARUANO         -0.9192    0.9128  -1.007  0.31483
DILUTORAndroMed:REPETB -3.1047    1.5990  -1.942  0.05319 .
DILUTOROptiXcell:REPETB 0.1522    1.5990   0.095  0.92424

```

```

DILUTORTRIS-Yema:REPETB      0.4263      1.5990      0.267      0.78999
DILUTORAndroMed:REPETC      -2.0972      1.5990     -1.312      0.19075
DILUTOOptiXcell:REPETC     -0.3566      1.5990     -0.223      0.82370
DILUTORTRIS-Yema:REPETC     -0.8938      1.5990     -0.559      0.57665
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 6.396 on 276 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8733,    Adjusted R-squared:  0.8683 
F-statistic: 173 on 11 and 276 DF,  p-value: < 2.2e-16

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA + REPET %in% DILUTOR, data = DATOS1)

$TIEMPO
              diff             lwr             upr p adj
pos congelado-24 horas -32.20285 -33.68669 -30.719      0

$DILUTOR
              diff             lwr             upr      p adj
OptiXcell-AndroMed    6.060208    3.884842    8.235574 0.0000000
TRIS-Yema-AndroMed   -1.163125   -3.338491    1.012241 0.4191297
TRIS-Yema-OptiXcell  -7.223333   -9.398699   -5.047967 0.0000000

$RAZA
              diff             lwr             upr      p adj
BLANCO-BAYO   -1.3834259   -3.534485    0.7676335 0.2851918
RUANO-BAYO    -0.9192037   -3.070263    1.2318557 0.5730841
RUANO-BLANCO   0.4642222   -1.782486    2.7109305 0.8775923

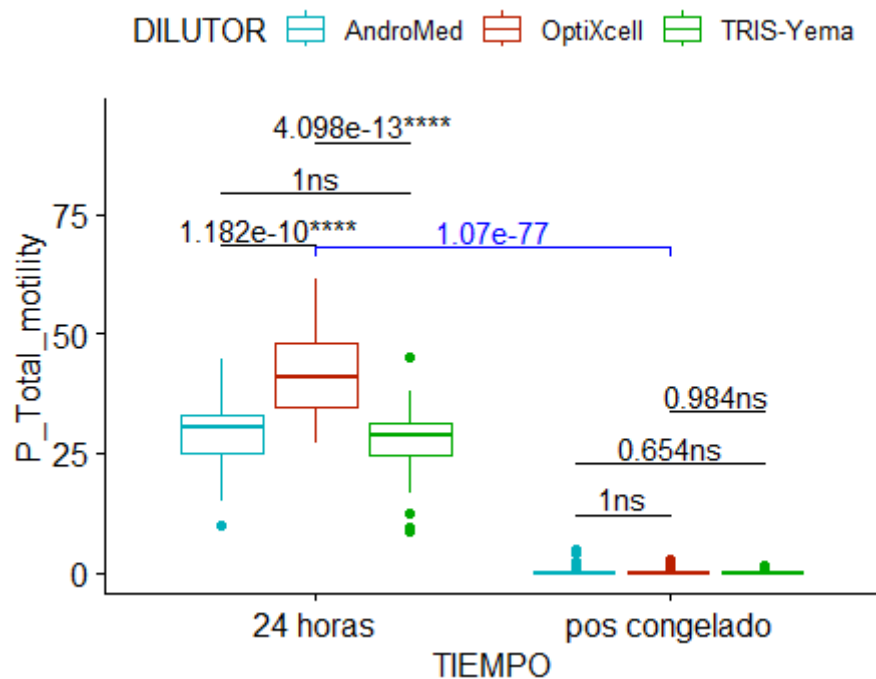
> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA
> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(P_Total_motility ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 × 11
  TIEMPO      .y.      group1 group2      n1      n2 statistic      df      p      p.adj
p.adj.signif
  <fct>      <chr>      <chr> <chr> <int> <int>      <dbl> <dbl>      <dbl> <dbl> <chr>
1 24 horas      P_Total_motili... Andro... OptiX...    48    48    -7.63   93.5 1.97e-11 1.18e-10 ****
2 24 horas      P_Total_motili... Andro... TRIS-...    48    48     1.32   93.9 1.89e- 1 1    e+ 0 ns
3 24 horas      P_Total_motili... OptiX... TRIS-...    48    48     8.79   93.8 6.83e-14 4.10e-13 ****
4 pos congelado P_Total_motili... Andro... OptiX...    48    48     0.677   75.2 5    e- 1 1    e+ 0 ns
5 pos congelado P_Total_motili... Andro... TRIS-...    48    48     1.63   57.2 1.09e- 1 6.54e- 1 ns
6 pos congelado P_Total_motili... OptiX... TRIS-...    48    48     1.41   75.0 1.64e- 1 9.84e- 1 ns
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "P_Total_motility",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-values SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> #) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> #)
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> #bxp + stat_pvalue_manual(

```

```

> # stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> # tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> #)
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(P_Total_motility ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 x 8
  .y.      group1    group2      n1    n2 statistic    df      p
  <chr>    <chr>    <chr>    <int> <int>    <dbl> <dbl>  <dbl>
1 P_Total_motility 24 horas pos congelado 144 144    38.4 144. 1.07e-77
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```



Anexo 19. Análisis de varianza para el porcentaje espermatozoides ViCA, considerando el efecto de los procedimientos de refrigeración por 24 horas a 5°C y criopreservadas en LN2

Espermatozoides ViCA 0 HORAS - REFRIGERADAS 24 HORAS

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/EV. MICROSCOPICA")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('DATOSM_LONG_TESIS.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h0 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "0 horas")
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> a<-ruano$P_ViCA
> b<-blanco$P_ViCA
> c<-bayo$P_ViCA
> # para determinar el numero de datos
> al<-ruano$ViCA
> bl<-blanco$ViCA
> cl<-bayo$ViCA
> #en dilutor
> d<-Tris$P_ViCA
> e<-OptiXcell$P_ViCA
> f<-Andromed$P_ViCA
> #para determinar el numero de datos
> dl<-Tris$ViCA
> el<-OptiXcell$ViCA
> fl<-Andromed$ViCA
> #en tiempo
> g<-h0$P_ViCA
> h<-h24$P_ViCA
> #para determinar el numero de datos
> gl<-h0$ViCA
> hl<-h24$ViCA
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA
> describe(a)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 30 38.93 12.13 41.04 39.23 16.48 19.62 56.31 36.69 -0.16 -1.42 2.21
> describe(al)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 30 83.1 25.63 87 83.71 32.62 41 125 84 -0.19 -1.33 4.68
> describe(b)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 30 42.49 11.48 45.17 42.73 8.93 17.39 66.06 48.67 -0.24 -0.31 2.1
> describe(bl)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 30 92.3 25.37 94 93.04 18.53 36 146 110 -0.26 -0.24 4.63
> describe(c)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 36 53.86 6.77 53.95 53.94 5.15 34.38 68.57 34.2 -0.31 0.77 1.13
> describe(cl)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 36 114.78 14.45 115.5 114.7 13.34 77 149 72 0 0.29 2.41
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR
> describe(d)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 32 40.26 12.53 42.43 40.7 12.46 17.39 61.68 44.29 -0.42 -1.01 2.22
> describe(dl)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 32 87 26.91 94 88.12 22.24 36 132 96 -0.53 -0.89 4.76
```

```

> describe(e)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 49.92 11.09  50.25  50.36 9.8 25.68 68.57 42.9 -0.48   -0.44 1.96
> describe(e1)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 107.16 24.01 106.5    108 24.46 57 149    92 -0.34   -0.54 4.24
> describe(f)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 46.73 10.68  49.17  47.48 8.25 24.77 63.98 39.21 -0.72   -0.6 1.89
> describe(f1)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 32 99.41 22.61 104.5   100.96 18.53 55 135    80 -0.75   -0.6 4
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR TIEMPO
> describe(g)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 49.45 11.24  52.15  50.2 7.82 20 68.57 48.57 -0.8    0.31 1.62
> describe(g1)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 106.15 24.03 109   107.67 17.05 43 149    106 -0.69    0.27 3.47
> describe(h)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 41.83 11.7   45.1   42.4 10.64 17.39 61.88 44.49 -0.46   -0.9 1.69
> describe(h1)
  vars n mean      sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1    1 48 89.56 24.86  95.5   91.2 23.72 36 125    89 -0.57   -0.82 3.59
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = VIVOS CON ACROSOMA
> VR1<-DATOS1$P_ViCa
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
TIEMPO          1   1396   1395.6    18.62 4.08e-05 ***
DILUTOR          2   1551    775.7     10.35 8.99e-05 ***
RAZA             2   4078   2039.0     27.21 5.73e-10 ***
Residuals       90    6745     74.9
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary.lm(MODELO1)

Call:
aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-20.922  -4.802   1.514   5.459  16.585

Coefficients:
              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    58.763     2.103   27.939 < 2e-16 ***
TIEMPO24 horas  -7.626     1.767   -4.315 4.08e-05 ***
DILUTOROptiXcell  3.188     2.164    1.473 0.14421
DILUTORTris - Yema -6.474     2.164   -2.992 0.00358 **
RAZABLANCO     -11.367     2.140   -5.312 7.79e-07 ***
RAZARUANO      -14.924     2.140   -6.974 5.01e-10 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 8.657 on 90 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.5102,    Adjusted R-squared:  0.483
F-statistic: 18.75 on 5 and 90 DF,  p-value: 1.002e-12

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

$TIEMPO
              diff            lwr             upr             p adj
24 horas-0 horas -7.625612 -11.1362 -4.115022 4.08e-05

$DILUTOR
              diff            lwr             upr             p adj
OptiXcell-Andromed  3.188103 -1.969424  8.345630 0.3086338
Tris - Yema-Andromed -6.474449 -11.631976 -1.316922 0.0099247
Tris - Yema-OptiXcell -9.662552 -14.820079 -4.505025 0.0000684

$RAZA
              diff            lwr             upr             p adj
BLANCO-BAYO -11.367263 -16.467163 -6.267364 0.0000023
RUANO-BAYO  -14.924110 -20.024010 -9.824211 0.0000000
RUANO-BLANCO -3.556847  -8.883518  1.769824 0.2546359

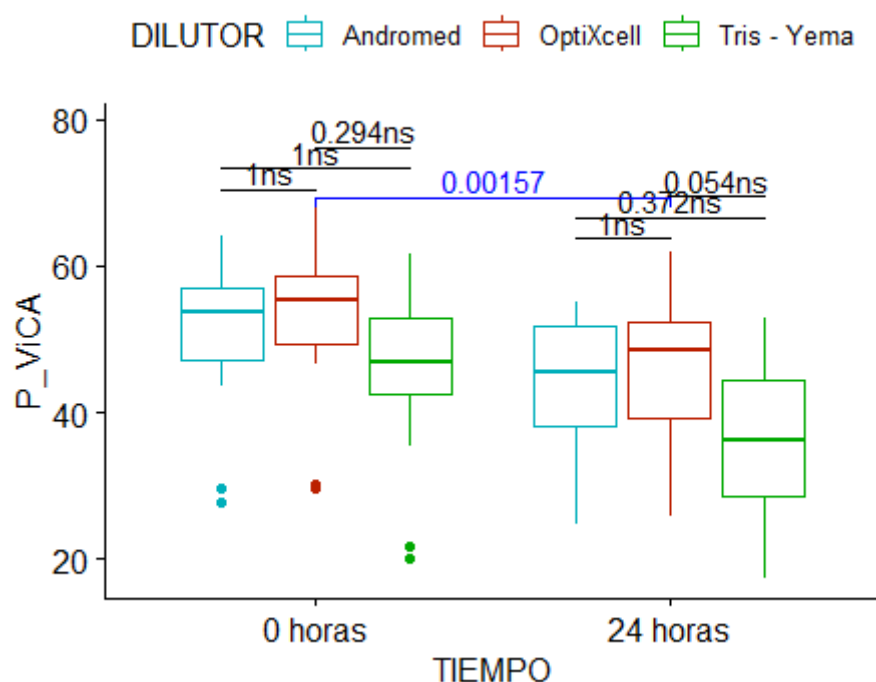
> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA

```

```

> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(P_ViCA ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 × 11
  TIEMPO .y. group1 group2 n1 n2 statistic df p p.adj p.adj.signif
<fct> <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 0 horas P_ViCA Andromed OptiXcell 16 16 -0.800 29.6 0.43 1 ns
2 0 horas P_ViCA Andromed Tris - Yema 16 16 1.36 29.6 0.184 1 ns
3 0 horas P_ViCA OptiXcell Tris - Yema 16 16 2.05 30.0 0.049 0.294 ns
4 24 horas P_ViCA Andromed OptiXcell 16 16 -0.918 30.0 0.366 1 ns
5 24 horas P_ViCA Andromed Tris - Yema 16 16 1.94 29.3 0.062 0.372 ns
6 24 horas P_ViCA OptiXcell Tris - Yema 16 16 2.80 29.2 0.009 0.054 ns
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "P_ViCA",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-values SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> # ) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> # )
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> # )
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(P_ViCA ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 × 8
  .y. group1 group2 n1 n2 statistic df p
* <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl>
1 P_ViCA 0 horas 24 horas 48 48 3.26 93.8 0.00157
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2
> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```



Espermatozoides ViCA
REFRIGERADAS 24 HORAS - POST DESCONGELACIÓN

```
> setwd("D:/DATA TESIS EYNAR2023/datos medidad repetidas 2-1-23")
> #
> ### OBJETIVO ### comparativo microscopio a 0 horas
> DATOS1<-read.csv('data_tesis_24_cong.csv', header = T, sep= ";")
> DATOS1$CODIGO<-as.factor(DATOS1$CODIGO)
> DATOS1$RAZA<-as.factor(DATOS1$RAZA)
> DATOS1$DILUTOR<-as.factor(DATOS1$DILUTOR)
> DATOS1$TIEMPO<-as.factor(DATOS1$TIEMPO)
> library(car)
> library(emmeans)
> library(psych)
> #
> # ESTADISTICA DESCRIPTIVA
> #
> #generar subconjuntos por raza
> ruano<-subset(DATOS1, RAZA == "RUANO")
> blanco<-subset(DATOS1, RAZA == "BLANCO")
> bayo<-subset(DATOS1, RAZA == "BAYO")
> #
> #RAZAS POR TIEMPO
> ruano24<-subset(ruano, TIEMPO == "24 horas")
> ruanoPC<-subset(ruano, TIEMPO == "pos congelado")
> blanco24<-subset(blanco, TIEMPO == "24 horas")
> blancoPC<-subset(blanco, TIEMPO == "pos congelado")
> bayo24<-subset(bayo, TIEMPO == "24 horas")
> bayoPC<-subset(bayo, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por DILUTOR
> Tris <-subset(DATOS1, DILUTOR == "Tris - Yema")
> OptiXcell<-subset(DATOS1, DILUTOR == "OptiXcell")
> Andromed<-subset(DATOS1, DILUTOR == "Andromed")
> #
> # dilutor a cada tiempo
> Tris24<-subset(Tris, TIEMPO == "24 horas")
> TrisPC<-subset(Tris, TIEMPO == "pos congelado")
> OptiXcell24<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "24 horas")
> OptiXcellPC<-subset(OptiXcell, TIEMPO == "pos congelado")
> Andromed24<-subset(Andromed, TIEMPO == "24 horas")
> AndromedPC<-subset(Andromed, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #generar subconjuntos por TIEMPO
> h24 <- subset(DATOS1, TIEMPO == "24 horas")
> hPC <- subset(DATOS1, TIEMPO == "pos congelado")
> #
> #variable de estudio en sub grupos
> #en razas
> #a<-ruano$P_ViCA
> #b<-blanco$P_ViCA
```

```

> #c<-bayo$P_ViCA
> #en razas dentro de las horas consideradas
> a_24h<-ruano24$P_ViCA
> a_PC<-ruanoPC$P_ViCA
> b_24h<-blanco24$P_ViCA
> b_PC<-blancoPC$P_ViCA
> c_24h<-bayo24$P_ViCA
> c_PC<-bayoPC$P_ViCA
> #
> # para determinar el numero de datos
> #a1<-ruano$ViCA
> #b1<-blanco$ViCA
> #c1<-bayo$ViCA
> #
> a1_24h<-ruano24$ViCA
> a1_PC<-ruanoPC$ViCA
> b1_24h<-blanco24$ViCA
> b1_PC<-blancoPC$ViCA
> c1_24h<-bayo24$ViCA
> c1_PC<-bayoPC$ViCA
> #
> #en dilutor
> #d<-Tris$P_ViCA
> #e<-OptiXcell$P_ViCA
> #f<-Andromed$PP_ViCA
> #
> #en dlutores dentro las horas
> d_24h<-Tris24$P_ViCA
> d_PC<-TrisPC$P_ViCA
> e_24h<-OptiXcell24$P_ViCA
> e_PC<-OptiXcellPC$P_ViCA
> f_24h<-Andromed24$P_ViCA
> f_PC<-AndromedPC$P_ViCA
> #
> #para determinar el numero de datos
> #d1<-Tris$ViCA
> #e1<-OptiXcell$ViCA
> #f1<-Andromed$ViCA
> #
> d1_24h<-Tris24$ViCA
> d1_PC<-TrisPC$ViCA
> e1_24h<-OptiXcell24$ViCA
> e1_PC<-OptiXcellPC$ViCA
> f1_24h<-Andromed24$ViCA
> f1_PC<-AndromedPC$ViCA
> #en tiempo
> #g<-h24$Porc_REACT
> #h<-hPC$Porc_REACT
> #para determinar el numero de datos
> #g1<-h24$reac
> #h1<-hPC$reac
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR RAZA EN CADA HORA
> #
> describe(a_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 32.39 9.92 31.25 32.09 9.93 19.62 49.01 29.39 0.27 -1.28 2.56
> describe(a1_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 68.53 20.33 65 68.31 29.65 41 99 58 0.1 -1.51 5.25
> describe(a_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 0.22 0.35 0 0.18 0 0 0.97 0.97 1.09 -0.41 0.09
> describe(a1_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 0.47 0.74 0 0.38 0 0 2 2 1.08 -0.43 0.19
> describe(b_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 40.07 10.02 39.74 40.94 12.36 17.39 51.54 34.15 -0.69 -0.6 2.59
> describe(b1_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 87.27 22.67 94 88.92 14.83 36 117 81 -0.76 -0.49 5.85
> describe(b_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 1.37 1.66 0.49 1.18 0.71 0 5.24 5.24 1.18 -0.09 0.43
> describe(b1_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 15 2.87 3.46 1 2.46 1.48 0 11 11 1.17 -0.1 0.89
> describe(c_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 18 51.15 6.43 51.66 51.53 3.85 34.38 61.88 27.5 -0.77 0.49 1.52
> describe(c1_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 18 109 12.24 110 110 9.64 77 125 48 -0.85 0.35 2.88
> describe(c_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1 1 18 0.3 0.73 0 0.15 0 0 3 3 2.84 7.67 0.17
> describe(c1_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se

```

```

X1      1 18 0.61 1.46      0      0.31 0 0 6      6 2.79      7.36 0.34
> #
> #DATOS DESCRIPTIVOS POR DILUTOR EN CADA HORA
> #
> describe(d_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 35.54 12.11 36.14 35.6 15.23 17.39 52.75 35.36 -0.07 -1.4 3.03
> describe(dl_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 77.06 26.94 78 77.29 31.88 36 115 79 -0.18 -1.49 6.74
> describe(d_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 0.45 0.78 0 0.3 0 0 3 3 2.14 4.36 0.19
> describe(dl_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 0.94 1.57 0 0.64 0 0 6 6 2.04 3.88 0.39
> describe(e_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 46.65 10.23 48.56 47.06 13.1 25.68 61.88 36.2 -0.46 -0.79 2.56
> describe(el_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 98.25 19.69 99.5 99.29 17.05 57 125 68 -0.54 -0.47 4.92
> describe(e_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 1.05 1.64 0.48 0.82 0.7 0 5.24 5.24 1.55 0.92 0.41
> describe(el_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 2.19 3.41 1 1.71 1.48 0 11 11 1.55 0.95 0.85
> describe(f_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 43.3 10.41 45.43 43.79 9.67 24.77 54.95 30.18 -0.64 -1.24 2.6
> describe(fl_24h)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 93.38 23.66 102 94.07 20.02 55 122 67 -0.56 -1.33 5.92
> describe(f_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 0.33 0.72 0 0.17 0 0 2.82 2.82 2.53 5.83 0.18
> describe(fl_PC)
vars n mean sd median trimmed mad min max range skew kurtosis se
X1      1 16 0.69 1.54 0 0.36 0 0 6 6 2.56 5.98 0.38
> #
> #VARIABLE RESPUESTA VR1 = VIVOS CON ACROSOMA
> VR1<-DATOS1$P_VICA
> #
> #ANOVA CON MODELO 1
> MODELO1=aov(VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)
> summary(MODELO1)

```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
TIEMPO	1	40773	40773	821.361	< 2e-16 ***
DILUTOR	2	565	283	5.694	0.00469 **
RAZA	2	1464	732	14.742	2.9e-06 ***
Residuals	90	4468	50		

```

---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
> summary.lm(MODELO1)

Call:
aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-20.717  -4.474   1.249   4.123  12.914

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)    46.929     1.712   27.415 < 2e-16 ***
TIEMPOpos congelado -41.217     1.438  -28.659 < 2e-16 ***
DILUTOROptiXcell    2.037     1.761    1.157  0.25051
DILUTORTris - Yema  -3.817     1.761   -2.167  0.03287 *
RAZABLANCO        -5.004     1.742   -2.873  0.00507 **
RAZARUANO         -9.423     1.742   -5.410  5.16e-07 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 7.046 on 90 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.9055,    Adjusted R-squared:  0.9002
F-statistic: 172.4 on 5 and 90 DF,  p-value: < 2.2e-16

> #prueba de tukey
> W<-TukeyHSD(MODELO1)
> W
    Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = VR1 ~ TIEMPO + DILUTOR + RAZA, data = DATOS1)

$TIEMPO

```

	diff	lwr	upr	p	adj
1 vs 2	-41.217	-42.917	-39.517	< 0.001	< 0.001
1 vs 3	-41.217	-42.917	-39.517	< 0.001	< 0.001
1 vs 4	-41.217	-42.917	-39.517	< 0.001	< 0.001
1 vs 5	-41.217	-42.917	-39.517	< 0.001	< 0.001
1 vs 6	-41.217	-42.917	-39.517	< 0.001	< 0.001
2 vs 3	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
2 vs 4	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
2 vs 5	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
2 vs 6	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
3 vs 4	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
3 vs 5	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
3 vs 6	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
4 vs 5	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
4 vs 6	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999
5 vs 6	0.000	-0.300	0.300	0.999	0.999

```

pos congelado-24 horas -41.21729 -44.07448 -38.3601      0

$DILUTOR
      diff      lwr      upr      p adj
OptiXcell-Andromed  2.037187 -2.160408  6.2347832 0.4821572
Tris - Yema-Andromed -3.817188 -8.014783  0.3804082 0.0824616
Tris - Yema-OptiXcell -5.854375 -10.051971 -1.6567793 0.0036472

$RAZA
      diff      lwr      upr      p adj
BLANCO-BAYO -5.004333 -9.155027 -0.85363959 0.0139072
RUANO-BAYO -9.422667 -13.573360 -5.27197292 0.0000015
RUANO-BLANCO -4.418333 -8.753592 -0.08307511 0.0447504

> # GENERANDO ANALISIS Y GRAFICOS ##### ***** VER LA VARIABLE RESPUESTA
> #
> #ANALISIS ESTADISTICO 1 "ENTRE DILUTORES EN FUNCION DEL TIEMPO" USANDO TEST CON AJUSTE DE
BONFERRONI
> stat.test <- DATOS1 %>%
+   group_by(TIEMPO) %>%
+   t_test(P_ViCA ~ DILUTOR) %>%
+   adjust_pvalue(method = "bonferroni") %>%
+   add_significance("p.adj")
> stat.test
# A tibble: 6 × 11
  TIEMPO      .y. group1 group2      n1      n2 statistic      df      p p.adj p.adj.signif
  <fct>      <chr> <chr>  <chr>    <int> <int>    <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 24 horas P_ViCA Andromed OptiXcell 16 16 -0.919 30.0 0.366 1 ns
2 24 horas P_ViCA Andromed Tris - Yema 16 16 1.94 29.3 0.062 0.372 ns
3 24 horas P_ViCA OptiXcell Tris - Yema 16 16 2.80 29.2 0.009 0.054 ns
4 pos congelado P_ViCA Andromed OptiXcell 16 16 -1.61 20.6 0.123 0.738 ns
5 pos congelado P_ViCA Andromed Tris - Yema 16 16 -0.476 29.9 0.638 1 ns
6 pos congelado P_ViCA OptiXcell Tris - Yema 16 16 1.31 21.4 0.203 1 ns
> #
> library(ggpubr)
> library(rstatix)
> library(nortest)
> library(lmtest)
> # CREANDO UN BOX PLOT MAS INFORMATIVO
> bxp <- ggboxplot(
+   DATOS1, x = "TIEMPO", y = "P_ViCA",
+   color = "DILUTOR", palette = c("#00AFBB", "#bb1f00", "#00A900")
+ )
> # ADICIONANDO LOS p-valores SOBRE LOS BOX PLOTS
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> stat.test <- stat.test %>% add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
>
> bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "p", tip.length = 0
+ )
> # Add 10% spaces between the p-value labels and the plot border
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p", tip.length = 0
> #) +
> #   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0, 0.1)))
> #
> # USANDO LOS P-VALORES AJUSTADOS CON METOD DE BONFERRONI, COMO NIVELES
> # QUITAR CORCHETES
> # bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "p.adj", tip.length = 0,
> #   remove.bracket = TRUE
> #)
> # Mostrar valores p ajustados y niveles de significancia
> # Ocultar ns (no significativo)
> #bxp + stat_pvalue_manual(
> #   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
> #   tip.length = 0, hide.ns = TRUE
> #)
> # TEST ESTADISTICO ADICIONAL PARA EVALUAR EL EFECTO DEL TIEMPO
> stat.test2 <- DATOS1 %>%
+   t_test(P_ViCA ~ TIEMPO, p.adjust.method = "bonferroni")
> stat.test2
# A tibble: 1 × 8
  .y. group1 group2      n1      n2 statistic      df      p
  <chr> <chr> <chr>    <int> <int>    <dbl> <dbl>    <dbl>
1 P_ViCA 24 horas pos congelado 48 48 24.3 47.9 1.39e-28
> #
> # Add p-values of `stat.test` and `stat.test2`
> # 1. Add stat.test
> stat.test <- stat.test %>%
+   add_xy_position(x = "TIEMPO", dodge = 0.8)
> bxp.complex <- bxp + stat_pvalue_manual(
+   stat.test, label = "{p.adj}{p.adj.signif}",
+   tip.length = 0
+ )
> #
> # 2. Add stat.test2

```

```

> # Add more space between brackets using `step.increase`
> stat.test2 <- stat.test2 %>% add_xy_position(x = "TIEMPO")
> bxp.complex <- bxp.complex +
+   stat_pvalue_manual(
+     stat.test2, label = "p", tip.length = 0.02,
+     step.increase = 0.1, color = "blue"
+   ) +
+   scale_y_continuous(expand = expansion(mult = c(0.05, 0.1)))
> #
> # 3. Display the plot
> bxp.complex
> #

```

