



La proteína recombinante de choque térmico HSPA1A incrementa la crioresistencia de espermatozoides de toro

José L. Sancho , Edinson P. Carrión , Estefany M. Largo¹ , Heydi I. Pando¹ ,
Mauricio Duma  , Antonio J. Vallecillo¹  , Diego A. Galarza²  

Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Universidad de Cuenca, Cuenca EC010221, Ecuador.

Recombinant heat shock protein HSPA1A increases cryoresistance of bull sperm

Abstract. This study evaluated the effect of recombinant heat shock protein HSPA1A on bovine sperm subjected to cooling (for 96 hours at 5 °C) and freezing process. An initial experiment determined the optimal concentration of HSPA1A (0, 15, 30, and 45 µg/mL) supplemented into the OPTIXcell extender, using 18 ejaculates (from 2 bulls) refrigerated for 96 hours. Subsequently, the effect of supplementing 45 µg/mL of HSPA1A (optimal concentration) into the OPTIXcell extender was evaluated, using 6 ejaculates subjected to freezing via static liquid nitrogen vapor. The results indicated that all concentrations of HSPA1A produced higher values for kinematic variables, viability, and acrosomal integrity compared to the control during 96 hours of refrigeration ($p < 0.05$). Additionally, 45 µg/mL HSPA1A showed a higher beat cross frequency (BCF) than the other HSPA1A concentrations ($p < 0.05$). After thawing, the motilities, BCF, and cryoresistance indices for motility, viability, and acrosomal integrity were higher in samples frozen with HSPA1A compared to the control ($p < 0.05$). In conclusion, the recombinant HSPA1A protein improved the motility, viability, and acrosomal integrity of refrigerated and cryopreserved bull sperm.

Keywords: HSPA1A, sperm cryoresistance, bovines

Resumen. Esta investigación evaluó el efecto de la proteína recombinante de choque térmico HSPA1A en espermatozoides bovinos sometidos a refrigeración durante 96 horas (5 °C), y congelación. Un experimento inicial determinó la concentración óptima de HSPA1A (0, 15, 30, y 45 µg/mL) suplementado al diluyente OPTIXcell, utilizando 18 eyaculados (de 2 toros) refrigerados durante 96 horas. Posteriormente, se evaluó el efecto de la suplementación de 45 µg/mL de HSPA1A (como concentración óptima) al diluyente OPTIXcell, utilizando 6 eyaculados sometidos a congelación mediante vapores de nitrógeno líquido estático. Los resultados indicaron que todas las concentraciones de HSPA1A produjeron mayores valores de las variables cinemáticas, de viabilidad y de integridad acrosomal que su control, durante 96 horas de refrigeración ($p < 0,05$). Además, con 45 µg/mL HSPA1A mostraron un valor más alto de frecuencia de batida de flagelo (BCF) que las otras concentraciones de HSPA1A ($p < 0,05$). Tras la descongelación, las motilidades, la BCF y los índices de crioresistencia de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal fueron mayores en muestras congeladas con la proteína HSPA1A comparadas con el control ($p < 0,05$). En conclusión, la proteína recombinante HSPA1A mejoró la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides de toro refrigerados y congelados.

Palabras claves: HSPA1A, crioresistencia espermática, bovinos

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca EC010205, Ecuador.

² Autor para la correspondencia: andres.galarza@ucuenca.edu.ec

A proteína de choque térmico recombinante HSPA1A aumenta a criorresistência do espermatozoide de touro

Resumo. Esta pesquisa avaliou o efeito da proteína de choque térmico recombinante HSPA1A em espermatozoides bovinos submetidos à refrigeração por 96 horas (5 °C) e ao congelamento. Um experimento inicial determinou a concentração ideal de HSPA1A (0, 15, 30 e 45 µg/mL) suplementado com diluente OPTIXcell, utilizando 18 ejaculados (de 2 touros) refrigerados por 96 horas. Posteriormente, avaliou-se o efeito da suplementação de 45 µg/mL de HSPA1A (como concentração ideal) ao diluente OPTIXcell, utilizando 6 ejaculados submetidos ao congelamento com vapores de nitrogênio líquido estático. Os resultados indicaram que todas as concentrações de HSPA1A produziram valores superiores das variáveis cinemáticas, viabilidade e integridade acrossomal do que seu controle, durante 96 horas de refrigeração ($p < 0,05$). Além disso, com 45 µg/mL de HSPA1A apresentaram um valor de frequência de batimento do flagelo (BCF) mais elevado do que as outras concentrações de HSPA1A ($p < 0,05$). Após o descongelamento, as motilidades, BCF e índices de criorresistência de motilidade, viabilidade e integridade acrossomal foram maiores nas amostras congeladas com proteína HSPA1A em comparação ao controle ($p < 0,05$). Em conclusão, a proteína recombinante HSPA1A melhorou a motilidade, viabilidade e integridade acrossomal de espermatozoides bovinos refrigerados e congelados.

Palavras-chave: HSPA1A, criorresistência espermática, bovinos

Introducción

Las proteínas de choque térmico (HSP) desempeñan un papel crucial en la protección celular frente al estrés inducido por cambios de temperatura y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Neuer et al., 2000). En el ámbito reproductivo, las proteínas HSP60 y HSP70 son particularmente relevantes en bovinos, debido a su función como chaperonas moleculares. La proteína HSP70 tiene efectos positivos en la criopreservación de espermatozoides (Syarifah et al., 2018; Zhang et al., 2015) y embriones bovinos (Stamperna et al., 2021) con resultados prometedores.

La proteína HSPA1A es un miembro de la familia HSP70 que desempeña un rol clave en la protección celular frente a diversos tipos de estrés (Rosyada et al., 2022). La HSPA1A interviene en el despliegue y replegamiento de proteínas, la prevención de la agregación y degradación de proteínas, y la regulación de la apoptosis celular (Mori

et al., 2015). Es por ello que la HSPA1A podría tener gran importancia para la criosupervivencia espermática. En estudios previos, se propuso que la HSPA1A forma una parte integral de los espermatozoides caprinos y es necesaria para su competencia estructural y funcional (Reddy et al., 2018). Asimismo, la transcripción de la proteína HSPA1A se correlacionó positivamente con la calidad del semen descongelado (Kumar et al., 2020). Hasta donde sabemos, no existe evidencia del uso de HSPA1A en la criosupervivencia de espermatozoides bovinos.

En este sentido, un primer experimento evaluó la concentración óptima de la proteína HSPA1A en espermatozoides bovinos almacenados a 5 °C durante 96 horas. Posteriormente, un segundo experimento evaluó el efecto de 45 µg/mL de la proteína HSPA1A en la congelación y descongelación de espermatozoides bovinos.

Materiales y Métodos

La proteína recombinante de choque térmico HSPA1A bovina (*Bos taurus*) fue obtenida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, mediante el empleo de un modelo de expresión bacteriano con la cepa recombinante de *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3): pET15b-HSPA1A y purificada por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Dializada en PBS 1X, pH 7,4 y ajustada a una concentración de 2,5 mg/mL (Información no publicada).

En el primer experimento se recolectaron 18 eyaculados de dos toros Holstein Friesian (fértils y de 24–36 meses) mediante vagina artificial (42–43 °C). Se recolectaron dos eyaculados de cada toro por semana (total: seis

eyaculados/toro), y con ello, se conformaron tres muestras de 'semen crudo' provenientes del eyaculado del toro 1, del toro 2 y su mezcla (total: 18 muestras de semen crudo). Cada muestra cruda se dividió en cuatro alícuotas para crear cuatro tratamientos según la concentración de la proteína HSPA1A añadida al medio OPTIXcell: 0 µg/mL (control); 15 µg/mL (15-HSPA1A); 30 µg/mL (30-HSPA1A); y 45 µg/mL (45-HSPA1A). Todos los tratamientos fueron ajustados a una concentración final de 25×10^6 espermatozoides/mL, y refrigerados a 5 °C durante 96 horas. La cinemática e integridad de membranas fueron evaluada a las 0 h, 48 y 96 horas de refrigeración.

Las variables cinemáticas fueron evaluadas mediante un sistema CASA (SCA©-2018). La viabilidad e integridad de

la membrana acrosomal fueron evaluadas mediante las tinciones fluorescentes yoduro de propidio y PNA-FITC aglutinina, respectivamente (Galarza et al., 2024).

Consecuentemente, en el segundo experimento se utilizaron seis eyaculados de dos toros, y cada uno se dividió en dos alícuotas para formar dos tratamientos según la adición de HSPA1A al medio OPTIXcell: control (n=24, 4 pajuelas/eyaculado) y 45-HSPA1A (45 $\mu\text{g/mL}$, n=24, 4 pajuelas/eyaculado). Las muestras espermáticas fueron congeladas utilizando un sistema de dos rampas de congelación contenidas dentro de una caja criogénica de poliestireno según lo detallado por Galarza et al. (2024). Se evaluó la cinemática espermática e integridad de membranas de las muestras espermáticas descongeladas (37 °C por 30 s). Además, se calcularon los

índices de crio-resistencia (ICR) de la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal [ICR= (valor post-descongelación/valor pre-congelación) x 100].

En el primer experimento se usó un ANOVA de medidas repetidas y la prueba de Fisher (LSD) para evaluar las concentraciones de la proteína HSPA1A (0, 15, 30 y 45 $\mu\text{g/mL}$), los tiempos de refrigeración (0, 48 y 96 horas) y su interacción. En el segundo experimento se usó un ANOVA de una vía y la prueba de Fisher (LSD) para analizar el efecto de la proteína HSPA1A. En los análisis de ambos experimentos se incluyó al eyaculado como factor aleatorio. La significancia se estableció en $p < 0,05$. Todos los cálculos se realizaron utilizando el software *Statistica* para Windows versión 12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EE. UU.).

Resultados

En el experimento 1 se comprobó una interacción significativa ($p < 0,05$) entre la concentración de la proteína HSPA1A y el tiempo de refrigeración, en todas las variables cinemáticas (con excepción del índice de rectitud, STR), en la viabilidad y en la integridad acrosomal. Los valores de todas estas variables disminuyeron significativamente a partir de las 48 horas de refrigeración ($p < 0,05$). Los tratamientos 15-HSPA1A, 30-HSPA1A y 45-HSPA1A produjeron valores significativamente más altos ($p < 0,05$) de velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL), STR y frecuencia de batida de flagelo (BCF) que su control, a 48 horas de refrigeración. Sin embargo, a las 96 horas, todos los tratamientos de la proteína HSPA1A exhibieron valores más altos ($p < 0,05$) en todas las variables cinemáticas, la viabilidad y la integridad acrosomal, comparadas con su control. En particular, las muestras del tratamiento 45-HSPA1A mostraron un valor más alto de BCF que los tratamientos 30-HSPA1A, 15-HSPA1A y el control a las 96 horas de refrigeración ($p < 0,05$) (Tabla 1).

En el experimento 2 se demostró que todas las variables cinemáticas disminuyeron significativamente después de la descongelación ($p < 0,05$). Los valores de BCF en las muestras frescas y en las muestras descongeladas del tratamiento 45-HSPA1A no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Tras la descongelación, la motilidad total ($77,8 \pm 0,7$ % vs. $72,0 \pm 1,1$ %) y progresiva ($70,2 \pm 1,2$ % vs. $63,8 \pm 1,5$ %), y la BCF ($11,8 \pm 0,2$ % vs. $10,6 \pm 0,16$ %) fueron mayores en las muestras espermáticas congeladas con el tratamiento 45-HSPA1A que en el control ($p < 0,05$). Finalmente, se comprobó que los índices de crio-resistencia de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal fueron mayores en muestras del HSPA1A comparadas con el control ($p < 0,05$) (Figura 1).

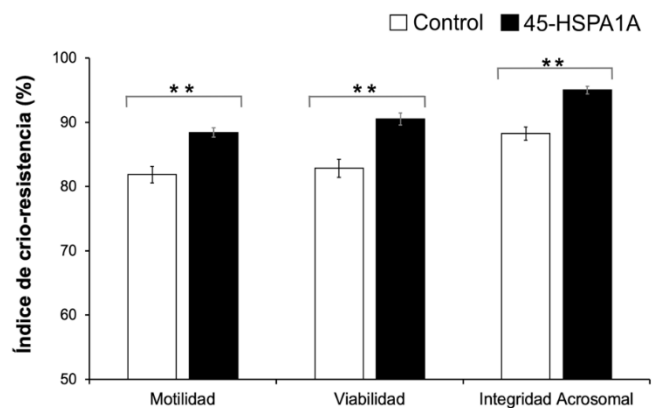


Figura 1. Índices de crio-resistencia (ICR) (media $\pm$ SEM) de la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides de toro congelados con 0 (control) y 45 $\mu\text{g/mL}$ de HSPA1A (45-HSPA1A). ** Diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,001$).

Discusión

La relación significativa entre la concentración de HSPA1A y el tiempo de refrigeración sugiere que la efectividad de la HSPA1A sobre la cinemática, viabilidad e integridad acrosomal fue más pronunciada a las 48 y 96 horas de refrigeración, lo que señala un efecto dependiente del tiempo. Este hallazgo resalta la importancia de optimizar las condiciones de almacenamiento, considerando tanto la concentración óptima de HSPA1A (45 $\mu\text{g/mL}$) como el tiempo de preservación para maximizar los beneficios en la calidad espermática. Este estudio representa el primer informe que describe los efectos beneficiosos de la HSPA1A exógena en la crioconservación de espermatozoides bovinos.

Tabla 1. Variables cinemáticas e integridad de membranas (media ± SEM) de espermatozoides de toro diluidos con OPTIXcell®, suplementados con 0 µg/mL (control), 15 µg/mL (15-HSPA1A), 30 µg/mL (30-HSPA1A) y 45 µg/mL (45-HSPA1A) de proteína recombinante de choque térmico HSPA1A, y refrigerados durante 96 horas a 5 oC (n=18 muestras/tratamiento)

Variables	Muestras frescas	Muestras refrigeradas durante 48 horas				Muestras refrigeradas durante 96 horas			
		Control	15-HSPA1A	30-HSPA1A	45-HSPA1A	Control	15-HSPA1A	30-HSPA1A	45-HSPA1A
Motilidad total (%)	90,1±0,59 ^a	83,5±0,60 ^b	84,2±0,82 ^b	84,1±0,72 ^b	83,9±0,90 ^b	73,9±1,20 ^e	75,9±0,84 ^e	76,6±0,77 ^e	76,6±1,03 ^e
Motilidad progresiva (%)	85,1±2,34 ^a	78,3±1,84 ^b	79,0±1,75 ^b	79,4±1,52 ^b	78,1±1,71 ^b	61,7±1,79 ^d	64,7±1,61 ^{cd}	65,3±1,04 ^{cd}	67,6±1,08 ^e
Velocidad curvilinea (µm/s)	121,7±5,90 ^a	98,5±2,82 ^c	106,1±3,27 ^b	105,7±2,65 ^b	114,6±2,94 ^{ab}	74,1±1,74 ^e	90,0±2,10 ^{cd}	92,1±2,50 ^{cd}	92,1±2,25 ^{cd}
Velocidad rectilinea (µm/s)	62,6±4,05 ^a	38,6±1,62 ^b	45,3±1,40 ^b	42,4±0,96 ^b	46,4±0,76 ^b	27,7±1,77 ^d	32,2±1,51 ^{cd}	33,9±1,28 ^{cd}	34,8±0,97 ^c
Rectitud (%)	75,7±2,10 ^a	70,9±2,08 ^b	76,5±1,06 ^a	74,3±0,96 ^a	76,8±0,76 ^a	66,0±1,91 ^d	71,9±0,97 ^{cd}	71,0±1,14 ^{cd}	72,2±1,03 ^{bc}
Linealidad (%)	55,6±2,94 ^a	43,2±1,85 ^b	45,5±1,12 ^b	42,5±1,43 ^b	44,2±0,82 ^b	34,8±1,54 ^d	37,1±1,04 ^{cd}	37,6±1,42 ^{cd}	39,8±1,65 ^{bc}
Frecuencia de batida de flagelo (Hz)	11,4±0,41 ^a	10,4±0,25 ^b	11,8±0,32 ^a	11,9±0,30 ^a	11,5±0,30 ^a	8,6±0,26 ^d	9,4±0,33 ^c	9,6±0,32 ^c	10,5±0,39 ^b
Viabilidad (%)	89,3±0,66 ^a	81,5±0,93 ^b	82,8±0,98 ^b	84,2±0,63 ^b	83,0±0,99 ^b	73,9±1,10 ^d	77,6±1,16 ^e	78,1±1,02 ^e	77,3±1,06 ^e
Integridad acrosomal (%)	94,3±0,71 ^a	89,8±0,65 ^b	91,2±0,63 ^b	91,0±0,58 ^b	90,3±0,82 ^b	82,8±0,72 ^c	86,6±0,87 ^b	87,6±1,00 ^b	88,5±0,96 ^b

a-e Diferentes superíndices en cada fila (variable) expresan diferencias significativas entre diferentes concentraciones de proteína HSPA1A y tiempos de almacenamiento en frío ($p < 0,05$ para a-b-c-d-e; $p < 0,01$ para a-c, b-d, c-e; $p < 0,001$ para a-d, a-e, b-e).

La proteína HSPA1A, miembro de la familia HSP70, regula el plegamiento, transporte y ensamblaje de proteínas en las membranas espermáticas (Rosyada et al., 2022). Se ha demostrado que las proteínas HSP70 contribuyen a la preservación del semen almacenado en frío, ya que reducen la actividad mitocondrial, lo cual es crucial para mantener la función espermática (Garriga et al., 2024; Zhang et al., 2015). Esto podría explicar la mayor resistencia al frío observada en los espermatozoides bovinos refrigerados durante 96 horas en presencia de la proteína HSPA1A.

La HSPA1A es un componente esencial de los espermatozoides y es necesaria para su competencia estructural y funcional (Kumar et al., 2020). Esta proteína se encuentra presente en los espermatozoides eyaculados de toros (Kamaruddin et al., 2004). Sin embargo, los efectos de la HSPA1A exógena en la criopreservación de espermatozoides bovinos aún no están del todo claros. Estudios proteómicos y genómicos han demostrado que la motilidad, viabilidad y función antioxidante, específicamente contra las ROS, en los espermatozoides post-descongelados se correlacionan positivamente con los niveles de expresión de las proteínas HSP70 (Pini et al., 2018; Reddy et al., 2018). Se ha propuesto que el aumento de la producción de HSP70 podría ayudar a los espermatozoides a sobrevivir al proceso de criopreservación (Zhang et al., 2015), al aumentar la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa, minimizar el daño en la membrana y reducir los efectos del estrés mitocondrial durante la criopreservación (Rosyada et al., 2022).

Por otro lado, el estrés físico y químico causado por el proceso de congelación y descongelación induce daños en la membrana plasmática del esperma debido al estrés oxidativo (Pintus et al., 2021). Las proteínas HSP70, al regular la actividad de diversas enzimas en los espermatozoides, juegan un papel clave en la preservación de la función celular (Zhang et al., 2015). Proponemos que la proteína HSPA1A, como miembro de la familia HSP70, pudo posiblemente haber facilitado un mejor funcionamiento de las enzimas antioxidantes contra las ROS, lo que resultó en una mejora en la motilidad y viabilidad durante el proceso de congelación.

Un hallazgo destacado en este estudio fue el aumento significativo de los valores de BCF en los espermatozoides refrigerados y/o congelados con HSPA1A. La evidencia obtenida demostró que la HSPA1A incrementó la hiperactivación del flagelo de los espermatozoides bovinos, lo cual se refleja en los altos valores de BCF. La hiperactivación del flagelo es



fundamental para la capacitación espermática y, en consecuencia, para la reacción acrosomal. Los espermatozoides con mayor hiperactivación del flagelo tienen un mejor desempeño en la penetración de los ovocitos a través de las células del cúmulo (Cummins and

Yanagimachi, 1986; Parrish, 2014). Bajo estas condiciones, los espermatozoides bovinos criopreservados con HSPA1A podrían ser utilizados eficazmente en la fecundación *in vitro*.

Conclusiones

Este estudio concluyó que la adición de la proteína recombinante de choque térmico HSPA1A al medio de refrigeración o congelación mejora la crioresistencia de los

espermatozoides de toro, evidenciado por el incremento en la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal

Agradecimientos

Los autores agradecen al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Cuenca, Ecuador, por el financiamiento otorgado (XIV-Convocatoria para el

financiamiento de proyectos de investigación) que permitió la obtención de la proteína recombinante de choque térmico HSPA1A bovina.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés

Literatura Citada

- Cummins, J.M., Yanagimachi, R., 1986. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro, in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Research*, 15:187–212.
<https://doi.org/10.1002/MRD.1120150302>
- Galarza, D.A., Jaramillo, J., Amón, N., Campoverde, B., Aguirre, B., Taboada, J., Samaniego, X., Duma, M., 2024. Effect of resveratrol supplementation in conventional slow and ultra-rapid freezing media on the quality and fertility of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 266:107495.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107495>
- Garriga, F., Maside, C., Padilla, L., Recuero, S., Rodríguez-Gil, J.E., Yeste, M., 2024. Heat shock protein 70 kDa (HSP70) is involved in the maintenance of pig sperm function throughout liquid storage at 17 °C. *Scientific Reports*, 14: 13383 (2024).
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-64488-5>
- Kamaruddin, M., Kroetsch, T., Basrur, P.K., Hansen, P.J., King, W.A., 2004. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia*, 36:327–34.
<https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.2004.00629.X>
- Kumar, A., Yadav, B., Swain, D.K., Anand, M., Madan, A.K., Yadav, R.K.S., Kushawaha, B., Yadav, S., 2020. Dynamics of HSPA1A and redox status in the spermatozoa and fluid from different segments of goat epididymis. *Cell Stress Chaperones*, 25:509–17.
<https://doi.org/10.1007/S12192-020-01102-3>
- Mori, M., Hayashi, T., Isozaki, Y., Takenouchi, N., Sakatani, M., 2015. Heat shock decreases the embryonic quality of frozen-thawed bovine blastocysts produced in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, 61:423–29.
<https://doi.org/10.1262/JRD.2015-003>
- Neuer, A., Spandorfer, S.D., Giraldo, P., Dieterle, S., Rosenwaks, Z., Witkin, S.S., 2000. The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Update*, 6:149–59.
<https://doi.org/10.1093/HUMUPD/6.2.149>
- Parrish, J.J., 2014. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81:67–73.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.08.005>
- Pini, T., Rickard, J.P., Leahy, T., Crossett, B., Druart, X., de Graaf, S.P., 2018. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *Journal of Proteomics*, 181:73–82.
<https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2018.04.001>
- Pintus, E., Luis, J., Santaella, R., Drevet, J.R., Sorrentino, R., 2021. Impact of Oxidative Stress on Male Reproduction in Domestic and Wild Animals. *Antioxidants*, 10(7):1154.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX10071154>
- Reddy, V.S., Yadav, B., Yadav, C.L., Anand, M., Swain, D.K., Kumar, D., Kritania, D., Madan, A.K., Kumar, J., Yadav, S., 2018. Effect of sericin supplementation on heat shock protein 70 (HSP70) expression, redox status and post thaw semen quality in goat. *Cryobiology*, 84:33–9.
<https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2018.08.005>

- Rosyada, Z.N.A., Ulum, M.F., Tumbelaka, L.I.T.A., Solihin, D.D., Purwantara, B., Memili, E., 2022. Implications of sperm heat shock protein 70-2 in bull fertility. *Veterinary World*, 15(6):1456-66 . <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1456-1466>
- Stamperna, K., Giannoulis, T., Dovolou, E., Kalemkeridou, M., Nanas, I., Dadouli, K., Moutou, K., Mamuris, Z., Amiridis, G.S., 2021. Heat shock protein 70 improves in vitro embryo yield and quality from heat stressed bovine oocytes. *Animals*, 11(6):1794. <https://doi.org/10.3390/ani11061794>
- Syarifah, F.S., Ibrahim, S.F., Ismail, N.H., Osman, K., Jaafar, F.H.F., Nang, C.F., Zuraina, F., Yusof, M., 2018. Quantification of HSP70 gene expression and determination of capacitation status of magnetically separated cryopreserved bovine spermatozoa at different thawing temperature and time. *Sains Malays*, 47:1101-08. <https://doi.org/10.17576/jsm-2018-4706-04>
- Zhang, X.G., Hong, J.Y., Yan, G.J., Wang, Y.F., Li, Q.W., Hu, J.H., 2015. Association of heat shock protein 70 with motility of frozen-thawed sperm in bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 60:256-62. <https://doi.org/10.17221/8239-CJAS>