

## **EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN VAGINAL EN ALGUNOS PARÁMETROS REPRODUCTIVOS DE BORREGAS SANTACRUZ INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE**

**Oscar Andrade Hernández<sup>1</sup>, Javier Valencia Méndez<sup>4</sup>, Agustín Orihuela Trujillo<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Bachillerato Tecnológico agropecuario No. 8 de Xoxocotla Morelos, México

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Apartado Postal 5-78. Cuernavaca Morelos 62051, México.

<sup>3</sup> Autor para correspondencia

<sup>4</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México

***Palabras clave: Ovejas, Estimulación vaginal, Tasa de ovulación, Inseminación artificial, Parámetros reproductivos.***

---

### **INTRODUCCIÓN**

En animales de ovulación inducida, la estimulación de vagina y cérvix con un rodillo de vidrio induce la ovulación (Leipheimer *et al*, 1984), además, la frecuencia de la estimulación coital juega un papel importante en la proporción de animales que ovulan (Wildt *et al*, 1980) y el número de embriones producidos (Roberts *et al*, 1999).

En ratas, la cópula parece tener un efecto al facilitar el desarrollo folicular y

la propia ovulación (Zarrow y Clark, 1968; Jiménez-Vargas *et al*, 1981).

En los animales de ovulación espontánea se han encontrado también algunos efectos de la estimulación vaginal. así, Parsons *et al*, (1967) encontraron que en ovinos la cópula afecta el momento de la ovulación y en cabras se ha demostrado que un servicio estéril acorta la duración del estro (Romano y Benech, 1996) e incrementa los índices de fertilidad cuando son inseminadas artificialmente (Romano *et al*, 2000). Asimismo, Romano (1994) logró el mismo efecto

mediante la estimulación mecánica de la vagina por medio de un dispositivo artificial.

Con base en lo anterior, el presente trabajo plantea estudiar el efecto de la estimulación vaginal en animales de ovulación espontánea como la oveja y determinar su efecto sobre algunas variables reproductivas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos se realizaron en el campo experimental de la universidad autónoma del estado de Morelos, México. 18° 37' y 99° 19', con una altitud de 2160 msnm, clima templado subhúmedo, con una precipitación y temperatura media anual de 1243 mm. y 20.8°C, respectivamente (Ornelas et al, 1990).

**Experimento 1.** El experimento se realizó en el mes de noviembre, utilizando 33 ovejas santacruz, nulíparas, de entre 50 a 60 kg de peso, las cuales se mantuvieron en pastoreo en un potrero con pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*) suplementándose a razón de 0.60 kg/animal/día con alimento concentrado comercial (la hacienda, México) 12% de proteína agua y sales minerales ad libitum.

Los animales se asignaron aleatoriamente en 3 grupos (n=11 por grupo). El primero fungió como grupo control, y fue aquel en el que no se llevó a cabo estimulación vaginal (T<sub>0</sub>). T<sub>1</sub> consistió en estimular la vagina inmediatamente después de haberse detectado en celo, y en T<sub>2</sub>, la estimulación se realizó inmediatamente

antes de proceder a la inseminación artificial.

La estimulación vaginal se realizó utilizando un dispositivo similar al pene del macho ovino fabricado en madera, de 26 cm de largo por 2 cm de diámetro mayor y 1.5 cm en su diámetro menor. La porción terminal del dispositivo simula el glande del pene, de forma aovada, con aproximadamente 1.8 cm de diámetro. En el otro extremo, se colocó un mango de forma cilíndrica, de 11 cm de largo y 2.5 cm de diámetro, para facilitar su manipulación (Figura 1).

Antes de introducir el dispositivo en cada hembra, este se cubrió con una funda de látex desechable y se lubricó exteriormente con gel neutro, no espermicida (Priority Care, First Priority, USA).

La estimulación se realizó introduciendo el dispositivo por la vulva hasta tocar el cervix, ejerciendo una leve presión sobre este, retirándolo sin sacarlo de la vagina, y volviéndolo a introducir suavemente en 5 ocasiones consecutivas.

El estro en las borregas se indujo en forma sincronizada mediante esponjas colocadas intravaginalmente que contenían 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA) (Chronogest, Intervet, México). Estas permanecieron en la vagina de los animales por 12 días. Al retirarlas se aplicó una inyección intramuscular de 400 U.I. de PMSG (Folligon, Intervet, México).

La detección del celo se realizó utilizando 3 machos ovinos Santacruz adultos criollos con experiencia sexual y buena libido, a los cuales se les colocó un mandil con el fin de evitar la cópula.

Los machos se introdujeron en el corral de las hembras por periodos de 30 min cada doce horas durante tres días consecutivos, a partir del retiro de la esponja.

Las hembras se consideraron en celo si permanecían inmóviles al momento de la monta por el macho.

En todas las inseminaciones se utilizó semen de un sólo semental Dorper con buena libido e historial de fertilidad. El semen se colectó por medio de vagina artificial y se colocó en baño María a 30 °C (Salamon y Maxwell, 1995). A cada eyaculado se le realizó un conteo de espermatozoides mediante un hematocitómetro. El semen se evaluó determinándose una motilidad mayor del 80% y un porcentaje de células anormales menor del 10%, para posteriormente hacer diluciones utilizando leche descremada ultra pasteurizada a razón de 2:1 a la cual se le agregó penicilina (1000 U.I. por ml. de diluyente) distribuyéndose en pipetas conteniendo 0.25 ml. para ser utilizado en una hora (Hafez, 1987). El semen se depositó en la os del cérvix de todas las ovejas (Chemineau *et al*, 1991) mediante popotes que contenían cada uno diluciones con 200 millones de espermatozoides viables, de acuerdo con Langford y Marcus, (1982). Las inseminaciones se realizaron cervicalmente 12 horas después de detectarse el estro (Ax *et al*, 2000).

Las variables evaluadas fueron: número de hembras que concibieron (determinado como el número de hembras de no retorno al estro), número de hembras paridas y el número de crías nacidas/número de hembras inseminadas.

El efecto de los tratamientos se determinó mediante una prueba de: Diferencia entre proporciones para muestras independientes (Montgomery y Runger, 1985).

**Experimento 2.** El experimento 2 se realizó en el mes de Enero, utilizando 21 ovejas Santacruz, nulíparas, de entre 50 a 60 kg de peso.

Los animales se asignaron aleatoriamente en los tres tratamientos descritos para el Experimento 1 (n = 7 por grupo).

El manejo de los animales y la metodología para la sincronización del celo, detección del estro y estimulación vaginal fueron similares al del Experimento 1.

La determinación de la tasa de ovulación se realizó utilizando un aparato de ultrasonido por vía rectal (Sonovet, U.S.A.) siete días después de haberse detectado el celo.

La variable evaluada fue: tasa de ovulación (número de cuerpos lúteos encontrados en ambos ovarios) y número de hembras con ovulaciones múltiples o sencillas. Para el análisis de los datos se utilizó una prueba de  $\chi^2$  para  $k$  muestras independientes (Siegel, 1979).

## RESULTADOS

**Experimento 1.** En el cuadro 1 se aprecia que aunque no hubo diferencia ( $p = 0.10$ ) entre el número de animales que concibieron y parieron en relación con el total de hembras inseminadas entre los tres tratamientos, se aprecia

una tendencia a favor de  $t_2$  comparado con el testigo (54.5 vs. 36.3 % y 36.36 vs. 18.18 %, respectivamente).

El número de crías nacidas en relación al número de animales inseminados fue similar entre  $T_1$  y  $T_0$  y entre  $T_1$  y  $T_2$  (54.5 vs. 63.6 %;  $P = 0.33$  y 54.5 vs. 27.2 % y  $P = 0.09$ , respectivamente). Sin embargo, en  $T_2$  se obtuvo un mayor porcentaje (63.6 vs. 27.2 %;  $P < 0.05$ ) comparadas con el control (Cuadro 1).

**Experimento 2.** Las tasas de ovulación promedio fueron de:  $1.86 \pm 0.11$ ,  $2.29 \pm 0.18$  y  $2.29 \pm 0.14$  CLs (media  $\pm$  e.e.) para  $T_0$ ,  $T_1$ , y  $T_2$ , respectivamente ( $P > 0.05$ ).

Se encontró una tendencia en favor de los grupos tratados a tener 100 % más animales con ovulaciones múltiples en comparación con el control ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

Las tasas de fertilidad observadas en el grupo control del presente estudio coinciden con las encontradas por Sánchez-partida *et al*, (1999) quienes encontraron tasas de 32.4 % en ovejas inseminadas cervicalmente con semen fresco. Sin embargo, en nuestro estudio, en los grupos que recibieron estimulación vaginal hay una tendencia a obtener tasas de fertilidad mayores.

En la literatura es posible encontrar información muy variada sobre tasas de concepción, dependiendo principalmente del protocolo utilizado para sincronizar el celo y/o del tipo de IA empleada. Así, Langford (1982; 1986)

informa de tasas de 33 - 67 % para ovejas tratadas con esponjas y PMSG, recibiendo una o dos inseminaciones con semen fresco.

La fertilidad en ovejas sincronizadas con progestágenos es generalmente baja comparado con la obtenida al inseminar a celo natural (Robinson, 1975; Gordon, 1977), quizá debido a la reducción de espermatozoides en el tercio anterior del cerviz que se encuentra en animales así tratados (Hawk *et al*, 1978; Evans y Armstrong, 1984). Aunado a esto, cabe mencionar que la fertilidad es más baja en las hembras jóvenes o primíparas que en los animales adultos (Langford, 1986; Salamon *et al*, 1990; Romano *et al*, 2000).

Lucidi *et al*. (2001) encuentran tasas de 53 - 73 % en animales sincronizados, inseminados artificialmente y expuestos a la presencia de un macho. Los resultados en nuestros grupos tratados se encuentran cerca del límite inferior de este rango, donde la cópula estéril seguramente colaboró en elevar los porcentajes, como lo hiciera la estimulación vaginal que se llevó a cabo en nuestro estudio.

En ovejas pelibuey con celo sincronizado y monta natural la tasa de parición es de 70-80 % (Cuevas *et al*, 1993) y de 75 % (Córdova *et al*, 1989) en ovejas inseminadas con semen fresco. en nuestro experimento se obtuvieron porcentajes de parto entre 18 a 36 % lo que supone un porcentaje de mortalidad embrionaria de cerca del 35-50 % (ya que la tasa de concepción fue de 36-54 %), sin embargo también pudieron deberse a errores en el diagnóstico de preñez ya que la tasa de no retorno al estro no es una buena

medida para determinar concepción. en la literatura se encuentran porcentajes de mortalidad embrionaria entre 9 y 58 % (Langford, 1986; Salamon et al, 1990; Perkins et al, 1992).

En nuestro experimento se aprecia que el número de corderos nacidos en relación al número de hembras inseminadas es mayor en aquellas que recibieron estímulo vaginal en comparación con las que no lo recibieron, lo que aparentemente se debe a un incremento en la tasa de ovulación.

En el ganado ovino la tasa de ovulación está predeterminada genéticamente y varía de uno a tres, dependiendo de la raza (Bartlewski *et al*, 1999). En la mayor parte de razas de ovejas la tasa de ovulación va de 1.2 que incluyen razas merino y 3.0 para finnish-landrace, esta última considerada como una raza de alto índice ovulatorio (Jainudeen *et al*, 2000). Las tasas de ovulación promedio encontradas para los grupos que recibieron estímulo en el presente trabajo (2.29) son ligeramente mayores que las informadas para razas consideradas como de alta prolificidad como la barbados blackbelly (Bradford y Quirke, 1986), consistentes con lo informado para razas con una alta incidencia de partos dobles tales como la javanesa (Sutama *et al*, 1988) y casi el doble para otras razas como la targhee (Bradford y Quirke, 1986). Además, las tasas de ovulación son mayores en los grupos estimulados en cerca de un 20 %, comparados con el control.

Lo anterior puede deberse a que al estimular la vagina se esté liberando oxitocina. En ovejas, la estimulación

vaginal mediante un espéculo así como la distensión vaginal, provocan un incremento en la actividad miometrial y liberación de oxitocina (Roberts y Share, 1968; Prud'homme y Rousseau, 1982; Bearden y Fuquay, 1982). La distensión vaginal durante la estimulación precoital y en el coito mismo, causan también liberación de oxitocina (Hafez, 1980) estimulando la contracción del músculo liso en el oviducto y el útero ayudando al transporte de los espermatozoides y del óvulo. Por otro lado, *Al-Janabi et al*, (1988) y King y Coetzer, (1996) encuentran que se pueden obtener mayores tasas de ovulación al administrar dosis bajas y repetidas de oxitocina durante el celo. Sin embargo, el mecanismo fisiológico que regula el incremento en la tasa ovulatoria aún no es claro. Se ha sugerido que el incremento en las tasas de ovulación puede deberse al extenderse el tiempo de reclutamiento y la selección de los folículos o a un aumento en el número de folículos reclutados (Scaramuzzi *et al*, 1993).

En el presente trabajo obtuvimos que el número de borregas con ovulaciones múltiples es el doble en los grupos tratados que en el grupo testigo. Sin embargo, salvo la tendencia informada, no se encontraron diferencias estadísticas quizás debidas al tamaño de la muestra y/o a la variabilidad encontrada en los tratamientos.

La estimulación vaginal puede tener un efecto variable, dependiendo del momento en que se aplique. En ratas se ha demostrado que tanto la sensibilidad como las propiedades de respuesta de las fibras aferentes periféricas de la vagina y útero varían de acuerdo al estado del celo (Bradshaw *et al*, 1999),

lo que sugiere que posiblemente el reflejo espinal y la secreción de oxitocina identificadas como respuestas (Prud'homme y Rousseau, 1982) también sean diferentes a lo largo del celo, afectando en forma diferente tanto el momento de ovulación como el transporte espermático. Esto podría explicar las diferencias encontradas entre T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, pero no las diferencias con el testigo.

## CONCLUSIONES

Se concluye que la estimulación física de la vagina en ovejas Pelibuey momentos antes de la IA aumenta la proporción del número de corderos nacidos a través de un posible incremento en la tasa de ovulación.

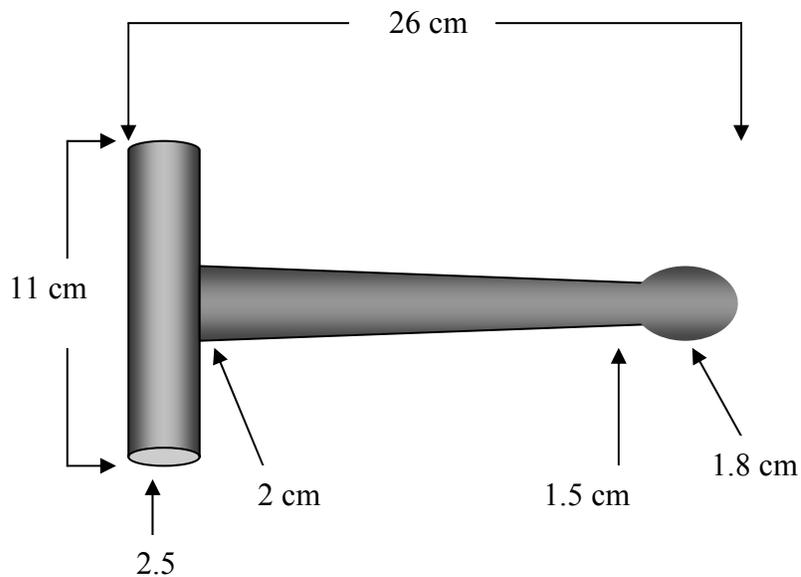


Figura 1. Dispositivo de madera, similar al pene del macho ovino utilizado para estimular la vagina de ovejas Santacruz con el fin de determinar su efecto en algunos parámetros reproductivos.

Cuadro 1. Efecto de la estimulación vaginal previa o al momento de la IA sobre algunos parámetros reproductivos en ovejas Santacruz.

Tratamiento	Número de hembras que concibieron/ número de hembras inseminadas (%)	Número de hembras que parieron//número de hembras inseminadas (%)	Número de crías nacidas/número de hembras inseminadas (%)
T <sub>1</sub>	5/11 (45.4)	3/11 (27.27)	6/11 54.54 <sup>a,b</sup>
T <sub>2</sub>	6/11 (54.5)	4/11 (36.36)	7/11 (63.63 <sup>b</sup> )
Control	4/11 (36.3)	2/11 (18.18)	3/11 (27.27 <sup>a</sup> )

T<sub>1</sub> –Estimulación vaginal al momento de detectarse el estro

T<sub>2</sub> -Estimulación inmediatamente antes de proceder a la IA

Control -Sin estimulación

<sup>a,b</sup> Valores con superíndice diferente en la misma columna son diferentes significativamente ( P< 0.05)

Cuadro 2.- Efecto de La Estimulación vaginal al momento del estro o al momento de la IA sobre la tasa de ovulación de borregas Santacruz

Ovulaciones	T <sub>1</sub> No. de borregas (óvulos)	T <sub>2</sub> No. de borregas (óvulos)	Control No. de borregas (óvulos)
<b>Sencillas</b>	<b>1 (1)</b>	<b>1 (1)</b>	<b>4 (4)</b>
<b>Múltiples</b>	<b>6 (15)</b>	<b>6 (15)</b>	<b>3 (9)</b>
Dobles	4 (8)	5 (10)	1 (2)
Triples	1 (3)	—	1 (3)
Cuádruples	1 (4)	—	1 (4)
Quíntuples	—	1 (5)	—
<b>Totales</b>	<b>7 (16)</b>	<b>7 (16)</b>	<b>7 (13)</b>
<b>Tasa de ovulación (media ± e.e.)</b>	<b>2.29 ± 0.18</b>	<b>2.29 ± 0.14</b>	<b>1.86 ± 0.11</b>

T<sub>1</sub> -Estimulación al momento de detectarse el estro

T<sub>2</sub> -Estimulación inmediatamente antes de proceder a la IA

Control -Sin estimulación

## LITERATURA CITADA

Al-Janabi AS, Alkass JE, Califa AA, (1988). Oxitocin induced ovarian and uterine changes in Awasi ewes. *World Review of Animal Production*. 24: 83-86.

Ax RL, Dally MR, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ML, (2000). Semen Evaluation. In: *Reproduction in Farm Animals*. Hafez E.S.E. (ed), Philadelphia: Lea & Fabiger, 365-373.

Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Chandolia RK, Honaramooz A, Rawlings NC, (1999). Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. *J. Reprod. Fertil.*, 115: 111-124.

Bearden HJ, Fuquay JW, (1982). *Reproducción Animal Aplicada*. Ed. El Manual Moderno. 1ª Ed. México, D.F., 41-43.

Bradford GE, Quirke JF, (1986). Ovulation rate and litter size of Barbados, Targhee and crossbred ewes. *J.Anim.Sci.*, 62: 905-909.

Bradshaw HB, Temple JL, Wood E, Berkley KJ, (1999). Estrous variations in behavioral responses to vaginal and uterin distention in the rat. *Pain*, 82: 187-197.

Chemineau P, Cagnie Y, Guerin Y, Orgeur P, Vallet JC, (1991). Female reproductive characteristics. In: *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*. Rome: FAO animal

*Production and Health Paper No. 83*, 222.

Córdova M, Feldman D, Valencia J, Ortiz A, (1989). Fertilidad de ovejas inseminadas utilizando dos diluyentes para semen fresco. *Vet.Mex.*, 20: 419-422.

Cuevas EA, Rodríguez HV, Gutierrez VR, Soto-Camargo R, Martínez RR, (1993). Sincronización de estro en ovejas Pelibuey con implantes nuevos y reciclados de Norgestomet. *Vet.Mex.*, 24: 327-330.

Evans G, Amstrong DT, (1984). Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J.Reprod.Fertil.*, 70: 47-53.

Gordon L, (1977). Application of synchronization of estrus and ovulation in sheep. Management of Reprod. In: *Sheep and Goats. Symp. Univ. of Wisconsin, Madison, July 24-25*, 15.

Hafez ESE, (1980). *Reproduction in Farm Animals*. (4<sup>th</sup>. ed), Philadelphia: Lea & Fabiger.

Hafez ESE, (1987). Artificial Insemination. In: *Reproduction in Farm Animals*. Hafez E.S.E. (ed), Philadelphia: Lea & Fabiger, 481-506.

Hawk HW, Conley HH, Cooper BS, (1978). Number of sperm in the oviducts, uterus, and cervix of the mated ewe as affected by exogenous estradiol. *J.Anim.Sci.* 46: 1300

Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE, (2000). Sheep and Goats In: *Reproduction in Farm Animals*.

Hafez, B./Hafez, E.S.E. (ed)  
Philadelphia, 172-178.

Jimenez-Vargas J, Guindo N, Marco J, (1981). Experimentación sobre ovulación refleja. *Rev.Univ.Navarra*, 25: 45-48.

King PR, Coetzer WA, (1996). Effect of oxytocin treatment during oestrus on ovulation rate of Merino ewes. *J.S.Afr.Vet. Assoc.* 67:42-13.

Langford GA, Marcus GJ, (1982). Influence of sperm number and seminal plasma on fertility of progestagen-treated sheep on confinement. *J.Reprod. Fertil.*, 65: 325-329.

Langford, G.A. (1982). Influence of PMSG and time of artificial insemination on fertility of progestogen-treated sheep in confinement. *J. Anim. Sci.*, 54: 1205-1211.

Langford GA, (1986). Influence of body weight and number of inseminations of fertility of progestogen-treated ewe lambs raised in controlled environments. *J. Anim.Sci.* 62: 1058-1062.

Leipheimer RE, Condon TP, Curry JJ, (1984). The role of neurotransmitters in mediating copulation-induced ovulation in the rat. *J.Endocrinol.*, 100: 361-365.

Lucidi P, Barboni B, Mattioli M, (2001). Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*, 9:1797-1805.

Montgomery DC, Runger GC, (1985). *Probabilidad y Estadística aplicadas a la ingeniería*. McGraw-Hill (ed.), México, D.F., 440-441.

Ornelas RF, Cambris CR, Bustamante OJ, (1990). *Delimitación y definición de agrohabitats del Estado de Morelos*. SARH. INIFAP, 15-18.

Parsons SD, Hunter GL, Rayner AA, (1967). Use of probit analysis in study of the effect of the ram on time of ovulation in the ewe. *J.Reprod.Fertil.*, 14: 71-79.

Perkins A, Fitzgerald JA, Price EO, (1992). Sexual performance of rams in serving capacity tests predicts success in pen breeding. *J.Anim.Sci.*, 70: 2722-2725.

Prud'Homme MJ, Rousseau JP, (1982). Study of uterine motor responses to vaginal and uterine stimulations in the ewe in estrus. *Reprod.Nutr.Dev.*, 22:597-610.

Roberts JS, Share L, (1968). Oxytocin in plasma of pregnant, lactating and cycling ewes during vaginal stimulation. *Endocrinology*, 83: 272-278.

Roberts L, Wolf K, Sprangel E, Ralf W, Wildt D, (1999). Prolonged Mating in Prairie Voles (*Microtus ochrogaster*) increases likelihood of ovulation and embryo number. *Biol. Reprod.*, 60: 756-762.

Robinson TJ, (1975). Contraception and sperm transport in domestic animals. In: *E.S.E. Hafez and C.J. Thibault (ed.). The Biology of Spermatozoa*. S. Karger, Basel, 202.

Romano JE, (1994). Effects of different stimuli of service on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology*, 42: 875-879.

Romano JE, Benech A, (1996). Effect of service and vaginal-cervical anesthesia on estrus duration in dairy goats. *Theriogenology*, 45: 691-696.

Romano JE, Crabo BG, Christians CJ, (2000). Effect of sterile service on estrus duration, fertility and prolificacy in artificially inseminated dairy goats. *Theriogenology*, 53: 1345-1353.

Salamon S, Maxwell WMC, (1995). Frozen storage of ram semen I: Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim.Reprod.Sci.*, 37: 185-249.

Salamon S, Evans G, Maxwell WMC, (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras.. Acribia (ed.). Zaragoza España*, 192 pp.

Sánchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Maxwell WM, (1999). Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *J.Androl.*, 20: 280-288.

Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, *et al* (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Repr.Fertil.Dev.*, 5: 459-478.

Shille VM, Munro M, Farmer SW, Paokoff H, Stabenfeldt GH, (1983). Ovarian and endocrine responses in cat after coitus. *J.Reprod.Fertil.*, 69: 29-39.

Siegel S, (1979). *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Trillas (ed.). México D.F.*, 64-67.

Sutama IK, Edey TN, Fletcher IC, (1988). Oestrous cycle dynamics in peripubertal and mature Jvanese thin-tail sheep. *Anim.Reprod.Sci.*, 16: 61-70.

Wildt, DE, Seager WJ, Chakraborty PK, (1980). Effect copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology*, 107: 1212-1217.

Zarrow MX, Clark JH, (1968). Ovulation following vaginal stimulation in spontaneous ovulator and its implications. *J.Endocr.*, 40: 343-352.