تأثير حقن الـ GnRH بعد التلقيح الاصطناعي في معدل الحمل عند الأبقار الحلوب

محمد مجد الحلبوني* جهاد مسوح**

(الإيداع: 8 حزيران 2022 ، القبول:20 آيلول 2022)

الملخص:

أجريت هذه الدراسة بهدف معرفة تأثير المعاملة بهرمون GnRH عند حقنه في اليوم (6 أو 12 أو في اليومين 6 و12) بعد التلقيح الاصطناعي لدى الأبقار الحلوب في معدل الحمل.

اشتملت الدراسة على 40 بقرة قسمت عشوائياً إلى 4 مجموعات، ضمت كل مجموعة 10 أبقار.

خضعت أبقار المجموعة الاولى G1 للمعاملة بهرمون Buserelin Acetate (Receptal®) المشتق الصنعي لهرمون الـ GnRH (10.5 ميكروغرام/بقرة) في اليوم 6 بعد التلقيح حقناً عضلياً، في حين تم حقن أبقار المجموعة الثانية G2 بنفس المعالجة في اليوم 12 بعد التلقيح، بينما حقنت أبقار المجموعة الثالثة G3 بنفس المعالجة في اليومين 6 و12 بعد التلقيح الاصطناعي كما حقنت أبقار المجموعة الرابعة G4 (مجموعة الشاهد) بالمحلول الفيزيولوجي في اليومين 6 و12 بعد التلقيح الاصطناعي. تم تشخيص الحمل لدى الأبقار باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية في اليوم 35 بعد التلقيح وبواسطة الجس الشرجي في اليوم 90 أظهرت النتائج وجود فرق معنوي ($P\leq0.05$) في نسبة الحمل في المجموعات G1 وG2 و G3 عند المقارنة مع مجموعة الشاهد G4، كما أظهرت النتائج ازدياد خطر فقدان الحميل بين اليوم 35 واليوم 90 بعد التلقيح الاصطناعي في مجموعة الشاهد G4 عند المقارنة مع المجموعات التي عوملت بالمعالجة الهرمونية، إذ بينت نتائج فحص الحمل في اليوم 90 بعد المعالجة فروقاً معنويةً لنسبة الحمل ($P< 0.05$) في المجموعات G1 وG2 و G3 عند المقارنة مع مجموعة الشاهد G4.

يمكن الاستنتاج من هذه الدراسة أن استخدام المعاملة بهرمون الـ GnRH في اليومين 6 و 12 بعد التلقيح يمكن أن تحسن نسبة الحمل والمحافظة عليه، حيث إن هرمون GnRH يعمل على دعم عمل الجسم الأصفر وزيادة نموه وتطوره وبالتالي الحماية من الموت الجنيني الناتج عن نقص في وظيفة الجسم الأصفر.

الكلمات المفتاحية: الأبقار الحلوب، GnRH، نسبة الحمل، التلقيح الاصطناعي.

*طالب دراسات عليا (ماجستير) – اختصاص تربية مجترات –قسم الانتاج الحيواني – كلية الطب البيطري – جامعة حماة.

**أستاذ مساعد في قسم الانتاج الحيواني – كلية الطب البيطري – جامعة حماة.

Effect of GnRH injection after artificial insemination on pregnancy rate in dairy cows

Jihad Massouh** M. Majd Al-Halbouni*

(Received: 8 June 2022, Accepted: 20 September 2022)

Abstract:

This study was conducted with the aim of knowing the effect of treatment with GnRH hormone when injected on the day (6, 12 or on days 6 and 12) after artificial insemination in dairy cows on the pregnancy rate.

The study included 40 cows divided randomly into 4 groups, each group included 10 of cows.

The first group G1 was treated with Buserelin Acetate (Receptal®), a synthetic derivative of GnRH hormone (10.5 µg/cow) on day 6 after artificial insemination, while the second group G2 was injected with the same treatment on day 12 after artificial insemination, while the third group G3 injected the same treatment on days 6 and 12 after artificial insemination, and the fourth group G4 (the control group) injected with the physiological solution on days 6 and 12 after artificial insemination.

The Pregnancy in cows was diagnosed using ultrasound on day 35 after insemination and by rectal palpation on day 90.

The results showed a significant difference ($P<0.05$) in the pregnancy rate in groups G1, G2 and G3 when compared with the control group G4, and the results also show an increased risk of pregnancy loss between day 35 and day 90 after artificial insemination in the control group G4 when compared with groups that it was treated with hormonal treatment, as the results of the pregnancy test on the 90th day after treatment showed significant differences in the percentage of pregnancy ($P < 0.05$) in groups G1, G2 and G3 when compared with the control group G4. It can be concluded from this study that the use of treatment with GnRH hormone on days 6 and day 12 after artificial insemination, the rate of pregnancy can be improved and maintained, as the GnRH hormone works to support the work of the corpus luteum and increase its growth and development, and thus protect against fetal death resulting from a deficiency in the function of the corpus luteum.

Keywords: Dairy cows, GnRH, Pregnancy rate, Artificial insemination.

*Postgraduate Student (Master) – Specialty of Ruminant Breeding – Department of Animal Production – College of Veterinary Medicine – University of Hama.

**Assistant Professor in the Department of Animal Production – College of Veterinary Medicine – University of Hama.

1-المـــقدمـة (Introduction):

تشكل الأبقار جزءً مهماً من الثروة الحيوانية، إذْ أن لتربية أبقار الحليب دوراً مهماً وأساسياً في تطور ونمو اقتصاد العديد من بلدان العالم، وتعد الكفاءة التناسلية (Reproductive Efficiency) من الصفات الاقتصادية وإحدى الدعائم الأساسية في تربية الأبقار، التي لها أثر كبير في ربحية منتجي أبقار الحليب (Keskin *et al.*,2010; Ribeiro *et al.*,2012)، لذا فإن الاهتمام بتحسينها يتطلب الاهتمام بالعوامل المؤثرة عليها، مما شجع على تطوير العديد من استراتيجيات الإدارة التناسلية المختلفة التي تركز على تحسين استخدام التلقيح الاصطناعي و تحسين معدل الحمل في قطعان الأبقار الحلوب (Thatcher *et al.*, 2006). ويعد الموت الجنيني المبكر أحد العوامل الرئيسية في انخفاض الكفاءة التناسلية في حيوانات المزرعة حيث يتم فقدان 30-40٪ من البويضات المخصبة خلال الأسابيع الثلاثة الأولى من الحمل (Walsh *et al.*,2011). كما إن حدوث الموت الجنيني المبكر أدى إلى طول الفترة بين ولادتين وانخفاض الأداء التناسلي لدى أبقار الحليب فضلاً عن الخسائر الاقتصادية الكبيرة للمربين (Ribeiro *et al.*,2012). يعد انخفاض تركيز هرمون البروجسترون قبل المرحلة الحرجة المعروفة بتمييز الأم للحمل (16 – 19 يوماً بعد التلقيح) من أهم الأسباب المؤدية إلى حدوث الموت الجنيني المبكر (Inskeep & Dailey, 2010).

إن حقن هرمون الـــ GnRH يستخدم في تقليل الموت الجنيني (Gordon,2011). لذلك فقد توجهت أنظار الباحثين واهتمامهم نحو هذه المرحلة إذْ قاموا باستخدام المعاملة الهرمونية في فترات مختلفة لتحسين الكفاءة التناسلية (Gordon,2004)، إذْ بين (Franco *et al.*,2006) أن معاملة عجلات وأبقار الحليب بهرمون الـ GnRH يحث على تكوين جسم أصفر ثاني، وزيادة مستوى البروجسترون كما تهدف إلى تطوير عمل الجسم الأصفر وخفض الموت الجنيني، وبالتالي إن استخدام المعاملة بهرمون الـ GnRH بعد التلقيح الاصطناعي يمكن أن يزيد من فرص التغلب على انخفاض نسب الحمل (Gordon,2011). لذلك فإن الهدف من هذه الدراسة هو معرفة تأثير حقن الـــ GnRH في معدل الحمل عند الأبقار الحلوب بعد حقنه في اليوم السادس واليوم الثاني عشر وفي اليومين السادس والثاني عشر بعد التلقيح الاصطناعي.

2-المواد وطرائق العمل (Materials and Methods):

أجريت الدراسة الحالية ضمن مزارع تربية خاصة في ريف حماة (قرية المباركات) التابعة لمحافظة حماة، ضمن الفترة من 2019/5/1 لغاية 2020/6/12 حيث ضمت (40) رأساً من الأبقار الحلوب ولدت مرة واحدة على الأقل ومعدل أعمارها (0.7±4.6) سنة و وبأوزان تتراوح بين (440 – 540) كغ ، ومعدل إنتاج حليبها (15-25) كغ يومياً في موسم الإنتاج. وقد خضعت للإشراف البيطري والإدارة والتغذية الموحدة. كما تم فحصها والتأكد من خلوها من المشاكل التناسلية (مبايض طبيعية – حالة الرحم و المهبل) وتم تأكيد خلو المبايض من أي تشكيلات مبيضية (جسم أصفر – تكيسات) والرحم طبيعي و خالٍ من السوائل والالتهابات الرحمية.

وزعت حيوانات التجربة عشوائياً إلى أربع مجموعات متساوية تضم كل منها 10 رؤوس من الأبقار. كما تم مراقبة علامات الشبق وتم إجراء التلقيح الأصطناعي عند ظهور علامات الشبق حسب الطريقة التقليدية (الشبق صباحاً – تلقيح مساءً) أي بعد 12 ساعة من ظهور الشبق. ولقحت الأبقار العائدة للشبق وعوملت بالمعاملة الهرمونية ذاتها (GnRH) وذلك ضمن كل مجموعة وفق الآتي:

- G1 (n=10): حقنت بـ 10.5 ميكروغرام من Buserelin Acetate (2.5 مل Intervet,Holland، Receptal®) في اليوم السادس بعد التلقيح الاصطناعي.
- G2 (n=10): حقنت بـ 10.5 ميكروغرام من Buserelin Acetate (2.5 مل Intervet,Holland، Receptal®) في اليوم الثاني عشر بعد التلقيح الاصطناعي.
- G3 (n=10): حقنت بـ 10.5 ميكروغرام من Buserelin Acetate (2.5 مل Intervet,Holland، Receptal®) في اليوم السادس وكذلك في اليوم الثاني عشر بعد التلقيح الاصطناعي.
- G4 (n=10): حقنت بالمحلول الفيزيولوجي في اليوم السادس واليوم الثاني عشر بعد التلقيح الاصطناعي.

تشخيص الحمل :

تم تشـــخيص الحمل بعمر 35 يوماً باســـتخدام جهاز التصـــوير بالأمواج فوق الصـــوتية (Ultrasounic Aloka Model:SSD-500) عن طريق المسـتقيم بالتردد (5 ميغاهرتز)(الشـكل رقم 1) وأعيد فحص الحمل باسـتخدام الجس الشرجي بعمر (90) يوماً.

الشكل رقم (1): تظهر الحمل في اليوم 35 بعد التلقيح (الطابعة Epson L3150).

المؤشرات المدروسة:

تم حساب نسبة الحمل (Pregnancy rate) وفقاً للمعادلة الآتية بحسب (Overton,2005).

$$\text{نسبة الحمل} = \frac{\text{عدد الحيوانات الحوامل}}{\text{عدد الحيوانات الكلية}} \times 100$$

التحليل الاحصائي:

اسـتعمل البرنامج (Spss 20) في التحليل الإحصـائي لدراسـة معدل الحمل. حيث اسـتعمل اختبار مربع كاي (Chi – Square) في مقارنة الفروق المعنوية بين النسب المدروسة.

3-النتائج (Results):

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($P\leq0.05$) لنسبة الحمل عند التلقيحة الأولى ما بين مجموعات التجربة ومجموعة الشاهد، إذْ بلغت نسبة الحمل بعد 35 يوماً 50% و 40% و 50% لمعاملات G1 وG2 وG3 وفي حين بلغت 30% في مجموعة الشاهد G4 (الجدول رقم 1). كما سجلت نسبة الحمل عند التلقيحة الثانية بعد 35 يوماً فروقاً معنوياً ($P\leq0.05$)، إذْ بلغت نسبة الحمل 40% و 50% و 60% في المجموعات G1 و G2 وG3 على التوالي في حين بلغت 28.5% في مجموعة الشاهد G4. كما بينت نتائج التأثير التراكمي للمعاملات ولتلقيحتين متتاليتين فروقاً معنويةً لنسبة الحمل ($P\leq0.05$) حيث بلغت نسبة الحمل 70 % و 70% و 80%، للمعاملات G1 و G2 و G3 على التوالي، بينما بلغت 30% في مجموعة الشاهد (G4) (الجدول رقم 1).

الجدول رقم (1): يظهر نسبة الحمل في اليوم 35 في مجموعات التجربة المختلفة (%).

	نسبة حدوث الشبق	نسبة حمل التلقيح الأول (اليوم 35)	نسبة الحمل في الدورة الثانية (اليوم 35)	التأثير التراكمي
المجموعة الأولى (G1)	(10/10) 100%	(10/5) %50 b	(5/2) %40b	(10/7) %70b
المجموعة الثانية (G2)	(10/10) 100%	(10/4) %40 b	(6/3) %50 b	(10/7) %70b
المجموعة الثالثة (G3)	(10/10) 100%	(10/5) %50 b	(5/3) %60b	(10/8) %80b
المجموعة الرابعة (G4) (الشاهد)	(10/10) 100%	(10/3) %30 a	(7/2) %28.5a	(10/5) %50a

كما تظهر النتائج ارتفاع معدل خطر فقدان الحميل بين اليوم 35 واليوم 90 بعد التلقيح الاصطناعي في مجموعة الشاهد G4 مقارنةً بالمجموعات التي تم حقنها بهرمون الـــــ GnRH حيث تم فقدان أحد الأجنة ما بين اليوم 35 واليوم 90 بعد التلقيح في مجموعة الشاهد G4 (الجدول رقم 2).

كما بينت نتائج التأثير التراكمي للمعاملات ولتلقيحتين متتاليتين فروقاً معنويةً لنسبة المحافظة على الحمل ($P\leq0.05$) حيث بلغت نسبة الحمل 70 % و 70% و 80% للمعاملات G1 و G2 و G3 على التوالي بينما بلغت 40% في مجموعة الشاهد (G4) (الجدول رقم 2).

الجدول رقم (2): يظهر نسبة المحافظة على الحمل في اليوم 90 في مجموعات التجربة المختلفة (%)

	نسبة الحمل التلقيح الأول اليوم 90	نسبة الحمل الدورة الثانية (اليوم 90)	التأثير التراكمي
المجموعة الأولى (G1)	(5/5) %100b	(2/2) %100a	(10/7) %70b
المجموعة الثانية (G2)	(4/4) %100b	(3/3) %100a	(10/7) %70b
المجموعة الثالثة (G3)	(5/5) %100b	(3/3) %100a	(10/8) %80b
المجموعة الرابعة (G4) (الشاهد)	(3/2) %66.6a	(2/2) %100a	(10/4) %40a

5-المناقشة (Discussion):

أظهرت نتائج البحث وجود اختلاف في نسبة الحمل بين الأبقار التي حقنت بالـ GnRH ومجموعة الشاهد. حيث تحسنت نسبة الحمل بشكل واضح لدى الأبقار المعاملة بهرمون الـ GnRH. وقد أتفقت نتائجنا في المجموعة الأولى مع ما جاء به كل من (Sterry *et al.*,2006) لدى أبقار الهولشتاين المعاملة بهرمون الـــ GnRH (100 ميكروغرام Cystorelin / بقرة) عند اليوم الخامس بعد التلقيح حيث تحسنت نسبة الحمل إذْ بلغت 51 % في الأبقار التي حقنت بهرمون الـ GnRH بينما بلغت 37.3% في مجموعة الشاهد.

و لكنها اختلفت مع نتائج (Khoramian *et al.*,2011) لدى معاملة أبقار الهولشـــتاين متكررة الإصـــراف (Repeat-breeder) بهرمون الـ GnRH (20 ميكروغرام Buserelin / بقرة) عند الأيام 5-6 بعد التلقيح حيث بلغت 26.9% في الأبقار المحقونة بهرمون الـــــ GnRH، واختلفت مع (Vasconcelos *et al.*,2011) لدى أبقار الهولشـتاين المعاملة بهرمون الـــ GnRH (100 ميكروغرام Gonadorelin/بقرة) عند اليوم السابع بعد التلقيح بعد خضوعها لبرنامج توحيد الإصـــراف باســـتخدام اللوالب المهبلية الحاوية على البروجســـترون (CIDR) حيث بلغت 27.1% في الأبقار المحقونة بهرمون الـــــ GnRH بينما بلغت 25.6% في مجموعة الشـاهد. وقد يعزى السـبب في اختلاف التتائج الى الإضـطراب الهرموني لدى الأبقار متكررة الإصراف أو نتيجة استخدام اللوالب.

وكذلك اتفقت نتائجنا في المجموعة الثانية مع ما ذكره (Yildiz *et al.*,2009) لدى معاملة أبقار من سلالات مختلفة (هولشتاين وبراون سويس و سمنتال) بهرمون الـ GnRH (10.5 ميكروغرام Receptal/ بقرة) عند اليوم الثاني عشر بعد التلقيح حيث بلغت نسبة الحمل 77.7% عند الحيوانات المحقونة بهرمون الـ GnRH بينما بلغت 50% في مجموعة الشاهد، كما اتفقت النتائج مع (Drew and Peters, 1994) عند معاملته الأبقار الحلوب بهرمون الـ GnRH (10 ميكروغرام Buserelin /بقرة) حيث بلغت نسبة الحمل 65.4% في الأبقار التي حقنت بهرمون الـ GnRH في حين بلغت 53.4% في مجموعة الشاهد. من ناحية أخرى، لم تتفق هذه النتائج مع ما وجده (Dirandeh *et al.*,2014) لدى أبقار الهولشتاين المعاملة بهرمون الـ GnRH (100 ميكروغرام Gonadorelin/ بقرة) عند اليوم الثاني عشر بعد التلقيح حيث بلغت نسبة الحمل 19% في الأبقار التي تم حقنها بهرمون الـ GnRH بينما بلغت 17.3% في مجموعة الشاهد. وقد يعزى سبب الاختلاف بالنتائج الى ارتفاع درجة حرارة الوسط المحيط في الدراسة السابقة.

كما إن زيادة معدل الحمل في المجموعة الثالثة مقارنةً مع مجموعة الشاهد ناتجة عن التأثير المشترك لحقنتين من الـ GnRH في اليوم السادس واليوم الثاني عشر، حيث أن حقن هرمون الـ GnRH يؤدي إلى المحافظة على الأجنة الناتجة من حويصلات مبيضية صغيرة الحجم من خلال إدامة عمل الجسم الأصفر لديها وإفرازه كمية أكبر من البروجسترون وبالتالي دعم نمو الأجنة وتطورها (Butcher *et al.*,1992) و إن هذا أدى إلى زيادة نسبة بقاء الأجنة حية وبالتالي زيادة معدل الحمل. إذْ إن زيادة معدل الحمل لدى أبقار المجموعة المحقونة بهرمون الـ GnRH مقارنةً بمجموعة الشاهد قد يعود الى حدوث موت جنيني مبكر في مجموعة الشاهد وعدم حدوثه في المجموعات المعالجة، حيث يحدث أغلب الموت الجنيني لدى أبقار الحليب في وقت مبكر جداً من الحمل (16 يوماً الأولى من الحمل تقريباً) خلال أو قبل تمييز الأم للحمل. إن أغلب هذه الحالات تعود إلى انخفاض تركيز هرمون البروجسترون في بلازما الدم (Lonergan,2011).

وجد (Peters *et al.*,2000) أن حقن الـ GnRH في اليوم 12 بعد التلقيح تحسن فرص نجاة الجنين من خلال دعم الوظيفة اللوتيئنية وبالتالي إفراز البروجسترون لاعطاء الفرصة للجنين حتى يتطور بشكل كافي يسمح له بإفراز بروتين نوعي يسمى بروتين الأرومة المغذية البقري btp-1 (bovine trophoblastic protein -1) وهو المسؤول عن منع إفراز البروستاغلاندين من بطانة الرحم بعد اليوم 15 – 16 من بداية الحمل.

بين (Bulbul *et al.*,2009) من خلال دراسته بأن حقن الـ GnRH عزز من تشكل جسم أصفر ثانوي من خلال الإباضة أو زيادة اللوتنة (40% إباضة، 60% زيادة اللوتنة) من الجريب السائد الموجود على سطح المبيض. وقد يكون حقن الـ GnRH حفز تحويل الخلايا اللوتيئنية الصغيرة في الجسم الأصفر إلى خلايا كبيرة ذات معدل إفرازي أعلى لهرمون البروجسترون (De Rensis & Peters, 1999).

6-الاستنتاجات (Conclusion):

إن حقن الـ GnRH بعد التلقيح الاصطناعي في اليومين السادس والثاني عشر يساعد في التقليل من الموت الجنيني والمحافظة على الحمل وبالتالي زيادة نسبة الحمل عند الأبقار .

7- التوصيات (Recommendations):

- تطبيق الدراسة الحالية على عدد أكبر من الأبقار.
- إجراء دراسات أخرى حول استخدام الـ GnRH لدى الأغنام والماعز لتحسين الكفاءة التناسلية.
- إجراء دراسة فيزيولوجية حول حقن الـ GnRH بعد التلقيح الاصطناعي عند الأبقار.

- دراسة أمكانية حقن هرمونات أخرى لتحسين الأداء التناسلي لدى الأبقار.

8-المراجع (References) :

1) **Butcher, R.L., Reber, J.E., Lishman, A.W., Breuel, K.F., Schrick, F.N., Spitzer, J.C. and Inskeep, E.K.(1992).** Maintenance of pregnancy in postpartum beef cows that have short-lived corpora lutea. J. Anim. Sci., 70:3831-3837.

2) **Bulbul, B., Kırbaş, M., Köse, M., Dursun, Ş., Çolak, M. (2009).** The effects of ovsynch started in different phases of oestrus cycle on oestrus synchronization in cows. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 35:7-17.

3) **De Rensis, F., Peters, A.R. (1999).** The control of follicular dynamics by PGF2α, GnRH, hCG and oestrus synchronization in cattle. Reprod. Dom. Anim., 34:49-59.

4) **Dirandeh, E., Roodbairi, A.R., Shohreh., B. (2014).** Effect of GnRH injection at day 6 and 12 after insemination on fertility of Holstein dairy cows during the warm season, 2(1):125-131.

5) **Drew, S.B. and Peters, A.R. (1994).** Effect of Buserelin on pregnancy rates in dairy cows. Vet. Rec., 134:267-269.

6) **Franco, M., Thompson, P.M., Brad, A.M. and Hansen, P.J. (2006).** Effectiveness of administration of gonadotropin-releasing hormone on days 11, 14, or 15 after anticipated ovulation for increasing fertility of lactating dairy cows and non-lactating heifers. Theriogenology, 66:945-954.

7) **Gordon, I. (2004).** Reproductive Technologies in Farm Animals. CABI Publishing, Cambridge, M.A.

8) **Gordon, M.B. (2011).** Strategies to improve ovulation synchronization /timed artificial insemination protocol to increase pregnancy rate in dairy cattle. PhD dissertation. The Faculty of graduate studies (Animal Science), University of British Columbia.

9) **Inskeep, E. K. and Dailey, R. A. (2010).** Maximizing Embryonic and Early Fetal Survival in Dairy Cattle. WCDS Advances in Dairy Technology, 22:51-69.

10) **Keskin, A., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Gumen, A., Karakaya, E., Darici, R., and Okut, H. (2010).** Effect of hCG vs. GnRH at the beginning of the Ovsynch on first ovulation and conception rates in cyclic lactating dairy cows. Theriogenology, 74: 602-607.

11) **Khoramian, B., Farzaneh, N., Garoussi, M.T. and Mohri, M. (2011).** Comparison of the effects of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin or progesterone on pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder dairy cows. Res. Vet. Sci., 90:312-315.

12) **Lonergan, P. (2011).** Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. Theriogenology, 76:1594-1601.

13) **Overton, M.W. (2005).** Incentives for increasing pregnancy rate. In: Dairy Incentives Pay, G.E. Billikof (Ed.), Chapter 3, 4th edn. University of California. pp. 35-42.

14) **Peters, A.R., Martinez, T.A. and Cook, A.J.C. (2000).** A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. Theriogenology, 54:1317-1326.

15) **Ribeiro, E.S., Galvão, K.N., Thatcher, W.W. and Santos, J.E.P. (2012).** Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. Anim Reprod., 9:370-387.

16) **Sterry, M., Welle, L., and Fricke, M.** (2006). Treatment with Gonadotropin-Releasing Hormone after First Timed Artificial Insemination Improves Fertility in Noncycling Lactating Dairy cows, American Dairy Science Association. 89:4237 – 4245.

17) **Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R., Santos, J.E. (2006).** Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. Theriogenology, 65:30–44.

18) **Vasconcelos, J.L.M., Sá Filho, O.G., Justolin, P.L.T., Morelli, P., Aragon, F.L., Veras, M.B., and Soriano, S. (2011).** Effects of post breeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. J. Dairy Sci., 94:223–234.

19) **Walsh, S.W., Williams, E.J. and Evans, A.C.O. (2011).** A review of the Causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Anim. Reprod. Sci., 123:127-138.

20) **Yildiz, H., Kaygusuzoğlu, E., Kaya, M. and Çenesiz. (2009).** Effect of post-mating GnRH treatment on serum progesterone, lutnizing hormone levels, duration of estrous cycle and pregnancy rate in cows. Pakistan Vet. J., 29:110-114.