

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Genética da Tolerância ao Estresse Calórico sobre a Produção
de Leite em Búfalas Leiteiras avaliado por Modelo de Norma
de Reação Genômica**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias, Câmpus Jaboticabal.

Dra. Gabriela Stefani Fernandez

Supervisor: Prof. Dr. Humberto Tonhati

Jaboticabal, SP

2024

Sumário

I.	Relatório de Atividades de Pesquisa Realizadas	3
1.	Introdução	5
2.	Objetivos	7
3.	Material e Métodos	8
3.1.	Fenótipos	8
3.2.	Genótipos	9
3.3.	Descritor ambiental	9
3.4.	Modelo de Norma de Reação	10
3.5.	GWAS	12
3.6.	Habilidade de predição nos diferentes níveis de THI	13
4.	Resultados e Discussão	14
5.	Conclusão	23
6.	Referências Bibliográficas	24

I. Relatório de Atividades de Pesquisa Realizadas

Genética da Tolerância ao Estresse Calórico sobre a Produção de Leite em Búfalas Leiteiras avaliado por Modelo de Norma de Reação Genômica

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da inclusão de informação genômica na predição do valor genético para produção de leite sob diferentes ambientes térmicos. Desta forma, estudamos 58.070 produções de leite no dia do controle de 3.459 primeiras lactações de búfalas, coletadas entre 1987 e 2018, pertencentes a 6 rebanhos (RN, SP e CE). Um total de 870 genótipos para 45.405 marcadores foram utilizados na análise. As variáveis climáticas foram fornecidas pelo INMET e combinadas em um índice de temperatura e umidade (THI). A estimativa dos valores genéticos para produção de leite no dia do controle ao longo dos valores de THI e dos dias em lactação foi realizada usando um modelo animal de regressão aleatória sob abordagens BLUP e ssGBLUP. O método ssGBLUP resultou em maiores estimativas de herdabilidade e variância genética aditiva, além de maiores acurácias em situações de estresse calórico e melhor modelagem da interação genótipo-ambiente, representando uma alternativa adequada para predizer os valores genéticos. Os resultados da análise GWAS foram apresentados com base na proporção de variância explicada por janelas de 5 SNPs adjacentes, e selecionadas as regiões que explicaram mais que 1% da variância da tolerância ao estresse calórico. Os genes ESRRG, SH3BGRL3, MYL9, IGSF5 e PCP4 são fortes candidatos para a associação com a tolerância ao estresse calórico na produção de leite.

Palavras-chave: interação genótipo-ambiente, estresse calórico, regressão aleatória, predição genômica, índice de temperatura e umidade

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the impact of including genomic information on prediction of breeding values for milk yield under different thermal environments. Thus, we studied 58,070 test-day milk yields of 3,459 first lactations, collected between 1987 and 2018, belonging to 6 herds (RN, SP and CE). A total of 870 genotypes for 45,405 markers were used in the analysis. The climatic variables were provided by INMET and combined into a temperature and humidity index (THI). The estimation of breeding values for test-day milk yield over the THI values and the days in milk was performed using a random regression animal model under BLUP and ssGBLUP approaches. The ssGBLUP method resulted in higher estimates of heritability and additive genetic variance, in addition to higher accuracy in heat stress situations and better modeling of the genotype by environment interaction, representing a suitable alternative to predict breeding values. The results of the GWAS analysis were presented based on the proportion of variance explained by windows of 5 adjacent SNPs, and the regions that explained more than 1% of the variance of tolerance to heat stress were selected. The ESRRG, IGSF5 and PCP4 genes are strong candidates for association with heat tolerance in milk yield.

Key-words: genotype by environment interaction, heat stress, random regression, genomic prediction, temperature–humidity index

1. Introdução

Búfalos (*Bubalus bubalis*) são animais reconhecidos por sua rusticidade, pois são adaptados a climas quentes e úmidos. De acordo com Damasceno et al. (2010), os búfalos representam uma opção interessante em áreas onde bovinos não se adaptam, o que contribui para o crescente uso de búfalos em várias regiões do mundo. O rebanho brasileiro de búfalos totaliza cerca de 1 milhão de cabeças no Brasil (IBGE, 2017), sendo criado predominantemente a pasto e em condições climáticas adversas. No entanto, há evidências na literatura de que os búfalos exibem sinais de sofrimento quando expostos à radiação solar direta, pois absorvem uma grande quantidade de radiação solar através de sua pele escura e pelagem escassa, além de sua reduzida capacidade de transpiração (Marai & Haezeb, 2010; Hussain, 2016).

De acordo com Dash et al. (2016), o estresse calórico é definido como o estado que provoca desequilíbrio no organismo do animal como resposta às condições ambientais desfavoráveis. Animais sob estresse calórico mostram redução no consumo alimentar e no metabolismo da água, reduzindo assim a eficiência da produção de leite (Habeeb et al., 2018; Hussain, 2016; Pragna et al., 2017). Marai & Haezeb (2010) destacam que o efeito negativo do estresse calórico sobre o desempenho produtivo e reprodutivo é agravada quando o calor é acompanhado por elevada umidade relativa do ar.

Vários índices foram desenvolvidos como preditores da influência negativa do estresse térmico sobre as características de produção de vacas e búfalas leiteiras em ambientes tropicais, e o mais amplamente difundido é o índice de temperatura e umidade (Temperature-humidity Index; THI), inicialmente desenvolvido para conforto humano, e posteriormente adaptado para gado (NRC, 1971). Este índice incorpora os dois elementos climáticos mais importantes e facilmente mensurados em um único valor: a temperatura e a umidade relativa do ar. O THI aliado a modelos de norma de reação tem sido amplamente utilizado para se inferir sobre o mérito genético dos animais para tolerância ao estresse calórico (Ravagnolo and Misztal, 2000; Aguilar et al., 2009).

Devido à importância do impacto do estresse calórico sobre a produção de leite, alguns estudos têm avaliado o declínio no desempenho produtivo de búfalas leiteiras em relação ao aumento do THI. Na Índia, Pawar et al. (2013) relataram uma queda na produção diária de leite de 4,46 para 3,65 kg, ou 18,2%, devido ao estresse térmico. No mesmo país, Choudhary & Sirohi (2019) encontraram uma queda na produção de leite maior que 1% para cada aumento de uma unidade de THI acima do nível crítico. Nasr (2017) estudou índices produtivos de búfalos cruzados no Egito sob condições de clima

quentes, e afirmam que o elevado THI causou uma queda significativa na produção diária e no pico de produção de leite em todas as composições raciais estudadas. O nível limiar do THI máximo encontrado na literatura para búfalos foi identificado com valores variando entre 74 e 75, com o declínio no desempenho produtivo ocorrendo após esse limiar (Behera et al., 2018; Dash, 2016; Choudhary & Sirohi, 2019). No Brasil, apesar de vários estudos destacarem a importância de estudar a influência do estresse calórico sobre a criação de bubalinos (Garcia, 2013; da Silva et al., 2015; Barros et al., 2015), nenhum estudo efetivamente avaliou seu impacto sobre a produção de leite.

Em vacas, um maior número de estudos foi conduzido para medir as perdas na produção de leite devido ao estresse térmico. Santana et al. (2017) estudaram vacas Holandesas criadas no Brasil e relataram que o estresse calórico causou uma queda na produção de leite em lactações avançadas variando de -0.22 a -0.52 kg/dia por cada aumento de uma unidade de THI. Para a mesma raça, em Luxemburgo, Hammami et al. (2013) relataram perdas na produção de leite de até -0,164 kg/dia por cada aumento de uma unidade de THI acima do nível limiar, podendo chegar a perdas de -0,955 kg para cada aumento de THI em níveis extremos. Em vacas primíparas. Na Itália, Bernabucci et al. (2014) concluíram que as vacas múltiparas são mais suscetíveis ao estresse térmico e que, em alguns casos, a perda de produção de leite em um único dia foi maior do que 1kg por animal. Já na raça Gir, Santana et al. (2015) estimaram perdas de -0.099 kg/dia por cada aumento de uma unidade de THI.

Outro fator importante relacionado ao estresse calórico é a interação genótipo x ambiente ($G \times E$). A identificação e seleção de animais geneticamente mais tolerantes ao calor pode ser útil para manter a elevada produtividade concomitantemente com a capacidade de sobrevivência quando expostos a condições adversas (Dash et al., 2016). No entanto, não existem estudos anteriores que tenham modelado este efeito com o intuito de estimar os parâmetros genéticos da produção de leite em resposta ao estresse calórico em búfalos leiteiros. Por outro lado, em gado leiteiro, diversos estudos identificaram $G \times E$ devido ao estresse térmico para a produção de leite, e concluíram que a seleção visando aumentar a produção de leite pode resultar em redução na tolerância ao estresse calórico (Aguilar et al., 2010; Bernabucci et al., 2014; Carabaño et al., 2014; Hammami et al., 2013; Santana et al., 2015; Santana et al., 2017).

Santana et al. (2015) afirma que a interação $G \times E$ para produção de leite devido ao estresse calórico pode levar a importantes erros na seleção de reprodutores sob níveis extremos de THI, pois podem ocorrer mudanças no ranking dos animais. A seleção de

animais geneticamente tolerantes ao calor pode se tornar uma meta importante para programas de melhoramento genético, no entanto, considerando que o teste de progênie é uma das fases mais caras e demoradas em um programa de melhoramento, é desejável projetar estratégias mais eficientes para modelar a interação G x E e melhorar a precisão da previsão (Morais Júnior et al., 2018). O método ssGBLUP (Melhor preditor linear genômico não viesado de passo único), permite a combinação simultânea de registros fenotípicos, genealogia e informação genômica disponíveis sem limitações no modelo de análise (Aguilar et al., 2010; Christensen and Lund, 2009; Legarra et al., 2009; Misztal et al., 2009), podendo acelerar o progresso genético, reduzir o intervalo de gerações e aumentar a precisão das estimativas de mérito genético (Morais Júnior et al., 2018; Vitezica et al., 2010).

A variação genética da sensibilidade da produção de leite ao meio ambiente indica que é possível selecionar animais que são mais resistentes ao estresse térmico. Os métodos tradicionais de seleção em animais leiteiros podem ser usados para alcançar essa mudança, no entanto exibem lenta taxa de ganho genético como resultado da herdabilidade e do longo intervalo de gerações (Garner et al., 2016; Nguyen et al. 2016). Sendo assim, os ganhos podem ser acelerados se os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) responsáveis pela interação G x E forem identificados e utilizados na seleção assistida por marcadores. Até o momento, não há relatos de estudos de mapeamento de genes candidatos sob uma estrutura de norma de reação genômica em bubalinos.

2. Objetivos

Os objetivos principais do presente estudo foram: (1) estimar os parâmetros genéticos da produção de leite na primeira lactação sob diferentes condições de ambiente térmico por meio da matriz de parentesco que combina pedigree e marcadores moleculares; (2) avaliar o efeito da inclusão de informações genômicas na predição do valor genético para produção de leite em diferentes ambientes térmicos; (3) testar a habilidade de predição do modelo de norma de reação genômica na estimativa dos valores genéticos; (4) estimar componentes genéticos para tolerância ao calor na primeira lactação; (5) identificar marcadores SNP em genes candidatos associados à tolerância ao estresse calórico na produção de leite que possam predizer parte da variação genética para esta característica.

3. Material e Métodos

Um total de 53.113 registros de controles leiteiros para produção de leite de 3.179 primeiras lactações de búfalas leiteiras, coletados entre 1987 e 2018, pertencentes a 6 rebanhos localizados em 3 estados brasileiros serão usados neste estudo. As informações foram cedidas pelo Programa de Controle Leiteiro mantido pela UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Departamento de Zootecnia.

3.1.Fenótipos

Os dados fenotípicos, genotípicos e de genealogia utilizados neste estudo foram cedidos pelo departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP de Jaboticabal, SP, Brasil. Os dados foram coletados entre 1987 e 2018 a partir da primeira lactação de búfalas Murrah pertencentes a 6 rebanhos localizados em 6 municípios de 3 estados brasileiros (Rio Grande do Norte, 43,5%; São Paulo, 42,8%; e Ceará, 13,7% das informações). Os animais foram criados predominantemente a pasto e em regiões caracterizadas pelos climas tropical úmido e semiárido. Estes rebanhos estão sob seleção há cerca de 20 anos, feita principalmente nos machos, com base no valor genético nacional para produção de leite aos 305 dias.

Os registros de produção de leite no dia do controle foram obtidos entre os dias 5 e 305 da primeira lactação, onde cada lactação deveria atingir no mínimo os cinco seguintes critérios: duração mínima de 90 dias; primeiro controle leiteiro anterior a 75 dias de lactação; no mínimo quatro controles leiteiros totais; ocorrendo entre os 22 e 60 meses de idade do animal; pertencer a animais com pelo menos um dos pais conhecido. Os grupos de contemporâneas (GC) foram definidos como rebanho-ano-mês do controle leiteiro, e deveriam conter no mínimo quatro animais. Registros com valores acima ou abaixo de 3,0 desvios-padrão em relação à média do GC foram desconsiderados. A partir de resultados de uma análise preliminar, seis classes de dias em lactação (DELc) com intervalos de 50 dias foram definidas (5-54, 55-104, 105-154, 155-204, 205-254, 255-305 dias). O arquivo de pedigree foi construído considerando 7 gerações anteriores a partir dos animais que continham informações fenotípicas ou genotípicas, totalizando 4.522 animais. Após as restrições, um total de 58.070 registros de produção de leite no dia do controle pertencentes a 3.459 primeiras lactações de búfalas foram mantidas no conjunto de dados.

3.2. Genótipos

Os animais foram genotipados utilizando o chip de genotipagem Affymetrix Axiom Buffalo (90k SNP; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). As posições dos marcadores para este chip são baseadas nas coordenadas do mapa water buffalo assembly da *University of Adelaide* (UOA WB v. 1, Affymetrix, 2016). O controle de qualidade dos genótipos foi realizado com base nos seguintes critérios de exclusão de marcadores: não mapeado; duplicado; não autossômico; com *call rates* inferiores a 0,90; com frequência do alelo menor (MAF) inferior a 0,05; com desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg superior a 0,15. Além disso, apenas amostras *call rates* superior a 0,90 foram mantidas nas análises. Após o controle de qualidade dos genótipos, foi utilizado nas análises um total de 45.405 informações de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) pertencentes a 870 búfalos leiteiros da raça Murrah, dos quais 782 têm registros fenotípicos.

3.3. Descritor ambiental

Os dados meteorológicos foram fornecidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, Brasília-DF, Brasil). As variáveis climáticas foram medidas em três momentos padronizados (09:00, 15:00, e 21:00 h) todos os dias em quatro estações meteorológicas localizadas a menos de 70 km das fazendas. A estação mais próxima de cada rebanho foi designada como a estação de referência para aquele rebanho. Os procedimentos de coleta de dados nas estações climáticas são padronizados em todo o país de acordo com as recomendações da Organização Meteorológica Mundial (World Meteorological Organization). As variáveis temperatura diária de bulbo seco (T; em °C) e umidade relativa do ar (UR; em %) do mesmo dia do controle leiteiro foram combinadas em um índice (THI) usando a equação descrita por NRC (1971):

$$THI = (1.8 \times T + 32) - (0.55 - 0.0055 \times UR) \times (1.8 \times T - 26)$$

Essa fórmula foi adotada pois é adaptada para as variáveis climáticas disponíveis nas estações climáticas Brasileiras (T e UR). Além disso, vários estudos mostram a utilidade desta fórmula para este tipo de estudo (Bohmanova et al., 2008; Brügemann et al., 2011 and 2012). O THI médio diário, obtido como a média ao longo de seis dias (cinco dias anteriores e o dia do controle leiteiro), foi atribuído a cada registro de produção de leite. A escolha de seis dias foi feita com base nos resultados de uma análise

preliminar, onde foi demonstrado que a média ao longo de seis dias explicava a maior variabilidade na produção de leite. Um procedimento semelhante foi adotado por Bohmanova et al. (2008) e Santana et al. (2017). Em seguida, os valores de THI foram arredondados em múltiplos de dois, com a primeira classe iniciando em THI=60 e a última classe com THI=80, totalizando 11 classes.

3.4. Modelo de Norma de Reação

Os parâmetros genéticos para a produção de leite no dia do controle ao longo dos valores de DIMc e THI foram estimados utilizando um modelo animal de norma de reação por meio de abordagem *weighted single-step genomic best linear unbiased prediction* (WssGBLUP). As regressões fixas e aleatórias sobre os DIMc foram modeladas utilizando polinômios de Legendre de ordem cúbica, com base nos resultados encontrados por Aspilcueta-Borquis et al. (2012). As regressões fixas e aleatórias sobre o THI foram modeladas com polinômios de Legendre de ordem linear, equivalente a um modelo de norma de reação clássico. De acordo com os resultados de uma análise preliminar, a variância residual foi considerada heterogênea ao longo da lactação (DIMc: 1, 2-4, e 5-6) e dos valores de THI (THI: 60-62, 64-80), resultando em 6 classes de diferentes combinações. O modelo de regressão aleatória pode ser descrito na forma matricial como:

$$y = FIXO_k + \sum_{n=1}^q \beta_{ln} \omega_n(d) + \sum_{n=1}^q \gamma_{ln} \omega_n(d) + \sum_{n=1}^q \delta_{ln} \omega_n(t) + \sum_{n=1}^q \varepsilon_{ln} \omega_n(t) + e_{ijklm},$$

onde y_{ijklmn} é o m -ésimo controle leiteiro do l -ésimo animal; $FIXO_k$ é a k -ésima combinação dos efeitos fixos dos GC, classes de combinação entre frequência de ordenha e DIMc, coeficiente de regressão para os efeitos linear e quadrático da idade da fêmea ao parto em meses, coeficientes de regressão para os efeitos linear, quadrático e cúbico do DIMc aninhados em classes que combinam o rebanho e ano do parto (arredondado em múltiplos de dois), e o coeficiente de regressão para o efeito linear de THI aninhado em DIMc; β_{ln} é o n -ésimo coeficiente de regressão para o efeito genético aditivo do animal l para DIMc; γ_{ln} é o n -ésimo coeficiente de regressão para o efeito de ambiente permanente do animal l para DIMc; δ_{ln} é o n -ésimo coeficiente de regressão para o efeito genético aditivo do animal l para THI; ε_{ln} é o n -ésimo coeficiente de regressão para o efeito de ambiente permanente do animal l para THI; q é o número de coeficientes de

regressão; $\omega_n(d)$ é o n -ésimo polinômio ortogonal de Legendre correspondente ao DIMc d ; $\omega_n(t)$ é o n -ésimo polinômio ortogonal de Legendre correspondente ao THI t ; e e_{ijklm} é o efeito aleatório residual. A estrutura de (co)variância é dada por:

$$\begin{bmatrix} \beta \\ \delta \\ \gamma \\ \varepsilon \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} H \otimes G_\beta & H \otimes G_{\beta\delta} & 0 & 0 & 0 \\ H \otimes G_{\delta\beta} & H \otimes G_\delta & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & I_l \otimes P_\gamma & I_l \otimes P_{\gamma\varepsilon} & 0 \\ 0 & 0 & I_l \otimes P_{\varepsilon\gamma} & I_l \otimes P_\varepsilon & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & I_m \sigma_{e_o}^2 \end{bmatrix}$$

where: G_β and G_δ são matrizes de (co)variância dos coeficientes de regressão aleatórios de dimensão dos efeitos genéticos aditivos por DIMc e THI, respectivamente; $G_{\beta\delta}$ e $G_{\delta\beta}$ são as matrizes de covariância dos efeitos genéticos aditivos para as combinações de DIMc e THI; H , melhor descrita mais abaixo, é a matriz híbrida de parentesco que combina as matrizes de pedigree e parentesco genômico, como descrito por Aguilar et al. (2010); $\otimes$ é o produto de Kronecker; P_γ e P_ε são as matrizes de (co)variância dos coeficientes de regressão aleatórios para os efeitos de ambiente permanente por DIMc e THI, respectivamente; $P_{\gamma\varepsilon}$ e $P_{\varepsilon\gamma}$ são as matrizes de covariância dos efeitos de ambiente permanente para as combinações de DIMc e THI; e $\sigma_{e_o}^2$ é a variância residual, com o variando de 1 a 6 de acordo com o número da classe residual; I_l é uma matriz identidade de tamanho apropriado para o efeito de ambiente permanente (l é o número de vacas com registros); e I_m é uma matriz identidade de tamanho apropriado para o resíduo (m é o número de controles leiteiros). A inversa da matriz H foi computada como segue (Aguilar et al., 2010):

$$H^{-1} = A^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & G^{-1} - A_{22}^{-1} \end{bmatrix}$$

onde: A é a matriz de parentesco genético aditivo entre todos os animais; A_{22} é a seção de A relacionada aos animais genotipados; G é a matriz de parentesco genômico, como proposto por VanRaden (2008), obtida por:

$$G = ZDZ'\lambda,$$

$$\lambda = 2 \sum_{j=i}^n p_j(1 - p_j),$$

onde: λ é uma constante de normalização.; Z é a matriz do conteúdo gênico ajustada pela frequência alélica; D é a matriz diagonal de ponderadores para as variâncias dos SNPs (inicialmente $D = I$); p_j é a frequência alélica do segundo alelo p do locus j .

Os componentes de (co)variância foram estimados por meio de abordagem Bayesiana, empregando-se o programa GIBBS3F90 (Misztal et al., 2002). A distribuição *a priori* Wishart invertida foi considerada para todos os efeitos aleatórios. A análise consistiu em uma cadeia única de 1.000.000 de ciclos, com um período de *burn-in* conservativo de 600.000 ciclos e um intervalo amostral de 30 ciclos. A convergência foi determinada pelo diagnóstico de Geweke (1991), inspeção das cadeias *a posteriori* dos parâmetros, e avaliando a autocorrelação e o tamanho efetivo das amostras dos parâmetros *a posteriori*.

3.5.GWAS

O software PostGSf90 (Aguilar et al., 2014) foi utilizado para obter os efeitos dos SNPs para o coeficiente de inclinação da norma de reação, que descreve a capacidade do animal em responder ao estresse calórico. O efeito do SNP foi derivado do valor genético-genômico (GEBV), de acordo com Henderson (1973):

$$\hat{u}_c = DZ'G^{-1}\hat{a}_g,$$

onde: $\hat{u}$ é o vetor dos efeitos dos SNPs para o c -ésimo coeficiente de regressão aleatória; $\hat{a}_g$ é o vetor de GEBVs; Z é a matriz do conteúdo gênico ajustado para as frequências alélicas; e G é a matriz de parentesco genômico. As estimativas dos efeitos dos SNPs foram usadas para estimar os ponderadores para o SNP i (Zhang et al., 2016), que são equivalentes às variâncias individuais de cada efeito de SNP:

$$\hat{\sigma}_{u,i}^2 = \hat{u}_i^2 2p_i(1 - p_i).$$

A fórmula acima foi usada para criar um algoritmo para estimar D no cálculo de uma “matriz re-ponderada G ” e melhorias nos pesos SNP foram obtidas iterativamente recalculando os efeitos dos SNPs. Essa metodologia foi totalmente descrita no estudo de Wang et al., 2012. Essas iterações aumentam os pesos dos SNP com grandes efeitos e diminuem aqueles com pequenos efeitos, essencialmente regredindo-os à média (Wang et al., 2014). Duas iterações foram realizadas para estimar a variância explicada por 5 janelas SNP adjacentes, para a prospecção de potenciais regiões do genoma com maiores efeitos na resistência ao estresse térmico. Os segmentos cromossômicos que explicaram mais que o limite de 1,0% da variância genética aditiva foram selecionados para definir as regiões genômicas importantes que estão associadas à característica do estudo.

O genoma de referência UOA WB v. 1 foi usado para pesquisar genes candidatos potencialmente associados aos SNPs selecionados. A ferramenta Genome Data Viewer

do genoma bubalino foi utilizada para a identificação dos genes, disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Genes mapeados em 200 Mb a montante ou a jusante dos SNPs selecionados foram considerados para capturar as regiões regulatórias e funcionais próximas aos SNPs, mas não necessariamente contidas neles (Peñagaricano et al., 2013).

3.6. Habilidade de predição nos diferentes níveis de THI

Para avaliar o efeito da inclusão das informações genômicas no modelo e investigar a eficiência da predição genômica ao longo dos diferentes ambientes térmicos, os componentes de (co)variância e os valores genéticos (EBV) também foram estimados por meio da abordagem tradicional (BLUP), no qual o mesmo modelo de norma de reação descrito acima foi utilizado, exceto pela substituição da inversa da matriz híbrida de parentesco H pela inversa da matriz A de parentesco genético aditivo.

Para ambos os modelos, os componentes de variância e herdabilidade foram estimados ao longo das escalas de DIMc e THI. Desta forma, para efeito de comparação, foram calculadas as médias destes parâmetros genéticos ponderadas pelo desvio-padrão das estimativas para cada THI de acordo com a fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i p_i}{\sum_{i=1}^n p_i}$$

$$p_i = \frac{1}{\sigma_i^2}$$

onde: $\bar{x}$ é a média ponderada de cada parâmetro genético para determinado THI; i refere-se a cada combinação entre determinado THI e as classes de DIMc; n é a quantidade de classes de DIMc; σ_i é o desvio-padrão das estimativas do parâmetro genético para determinado THI em combinação com as DIMc.

O efeito genético aditivo dos coeficientes de regressão aleatória foi usado para derivar o EBV e o GEBV para cada DIMc e THI. Sendo assim, o EBV e o GEBV de um animal i foram calculados como:

$$(G)EBV_i^{j,k} = \phi_{(j)k} \hat{\alpha}'_i$$

onde: $\hat{\alpha}'_i$ é o vetor dos valores genético aditivos estimados para os coeficientes de regressão ortogonal do animal i (coeficientes correspondentes a DIMc e THI); $\phi_{(j)k}$ é um vetor de coeficientes ortogonais avaliados no THI j e DIMc k . Assim, os EBVs e GEBVs para produção de leite aos 305 dias (EBV305 e GEBV305) foram calculados como a soma dos EBVs/GEBVs dos dias 5 até 305 dias da lactação em um valor de THI de

interesse. Para estudar as diferenças na sensibilidade térmica dos animais e os efeitos da inclusão das informações genômicas sobre a seleção, foi analisado o padrão de resposta do EBV305 e GEBV305 de 30 touros (com no mínimo 10 filhas) ao longo da escala de THI. Esses 30 touros foram selecionados com base no maior valor de EBV305 em um ambiente de conforto térmico (THI = 72). Além disso, foi calculada a correlação de Pearson entre o EBV305 e o GEBV305 de todos os touros com no mínimo 10 filhas (total de 85 touros) ao longo da escala de THI.

Para avaliar a habilidade de predição do modelo para as características estudadas, foi adotado um esquema de validação em animais jovens. Para representar a seleção genômica em idade muito jovem, quando o desempenho próprio do animal ainda não está disponível, foi criado um conjunto de dados reduzido, excluindo o fenótipo dos animais mais jovens (controles coletados de 2010 em diante). A população de validação foi composta pelos 150 animais mais jovens genotipados. O conjunto de dados reduzido foi utilizado para estimar os EBV305 via abordagem BLUP e os GEBV305 via abordagem ssGBLUP para os animais da população de validação.

Para avaliar o viés de predição em cada ambiente térmico foram avaliados os coeficientes de regressão, estimados usando uma regressão linear dos GEBV/EBV305 dos animais de validação estimados obtidos pelo conjunto de dados reduzido sobre seus EBV305 obtidos pelo conjunto de dado completo, para cada THI. O modelo de regressão linear será:

$$y_c = 1b_0 + b_1\hat{a}_r + e,$$

onde: y_c refere-se ao EBV305 dos animais de validação obtidos pelo conjunto de dados completo em um THI de interesse; b_0 e b_1 referem-se ao intercepto e coeficiente de regressão, $\hat{a}_r$ refere-se ao GEBV305 ou EBV305 dos animais de validação, obtidos pelo conjunto de dados reduzido em um THI de interesse, e refere-se ao resíduo. O b_1 será utilizado como indicador de viés. A acurácia de validação (r) será calculada a partir do coeficiente de determinação (r^2) da equação de regressão.

4. Resultados e Discussão

Na Figura 1 é possível observar que, para ambas as análises, houve uma variação nos valores dos parâmetros genéticos ao longo da escala THI, indicando a presença de interação G x E. As estimativas de herdabilidade apresentaram baixas a moderadas magnitudes. Tanto as estimativas de variância genética aditiva quanto as de herdabilidade

foram superiores em valores extremos de THI. Isso pode ter ocorrido pois os animais não são selecionados para tolerância ao estresse térmico. Além disso, a seleção para produção de leite ocorre principalmente sob conforto térmico (THIs medianos), reduzindo assim a variabilidade genética nesses ambientes. O modelo utilizado sob abordagem ssGBLUP, que incluiu as informações genômicas, apresentou estimativas de variância genética aditiva e herdabilidade superiores às do BLUP, principalmente em valores baixos de THI. Isso pode ser explicado porque a inclusão de informações genômicas pode melhorar a conexão entre diferentes níveis de THI, que ocorre por meio de melhores relações genéticas entre os animais, o que afeta as estimativas.

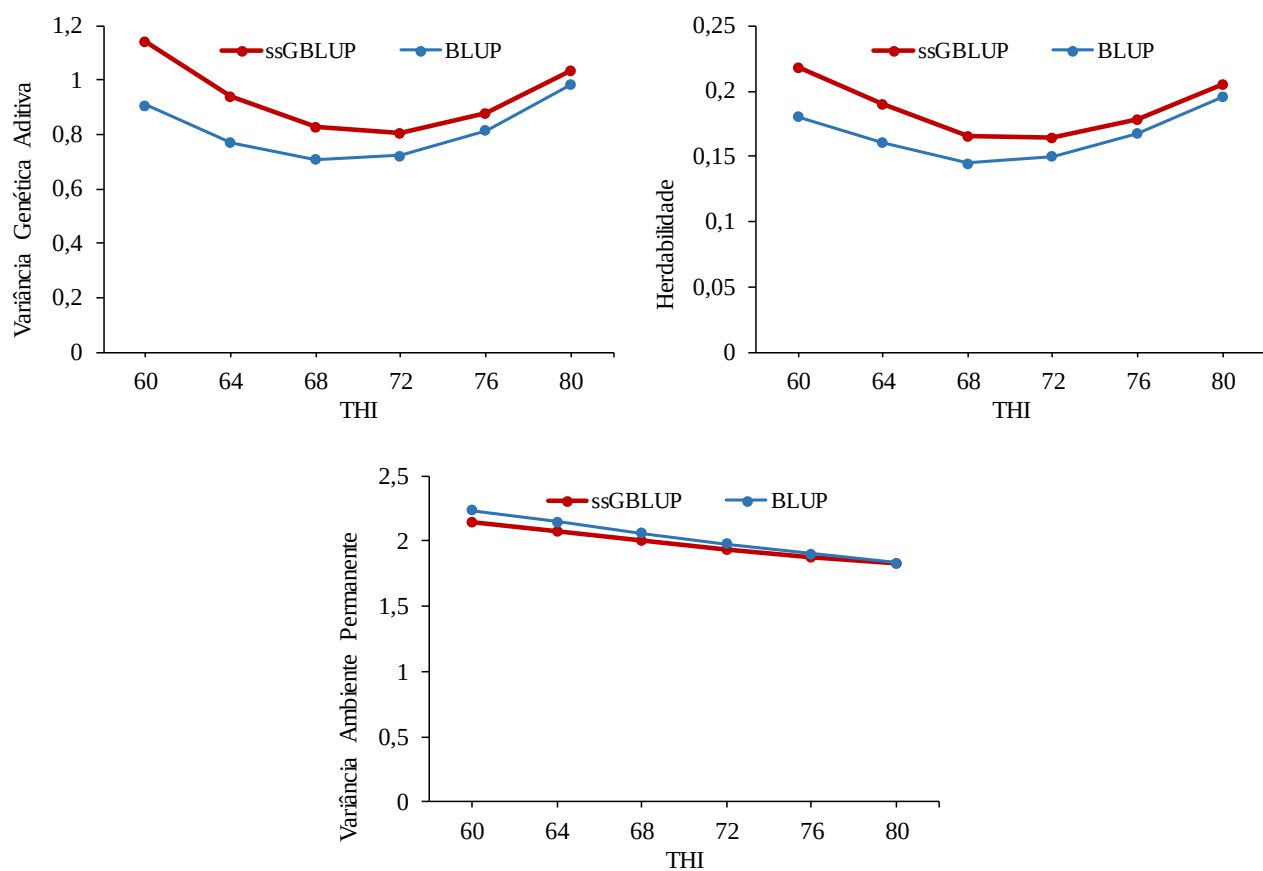


Figura 1. Médias ponderadas pelo desvio-padrão para as estimativas de variância genética aditiva, variância de ambiente permanente e herdabilidade da produção de leite no dia do controle em diferentes níveis do índice de temperatura e umidade (THI).

Valores moderados de correlações genéticas foram encontrados entre as estimativas da produção de leite no dia do controle em valores extremos de THI (Figura 2), indicando a presença de interação G x E. De acordo com Robertson (1959), correlações genéticas abaixo de 0,80 indicam evidências de interação G x E. Menores valores foram encontrados através da análise ssGBLUP. Portanto, uma maior interação

G x E pode ser esperada, o que pode levar a uma importante reclassificação dos animais com base no GEBV entre os níveis de THI.

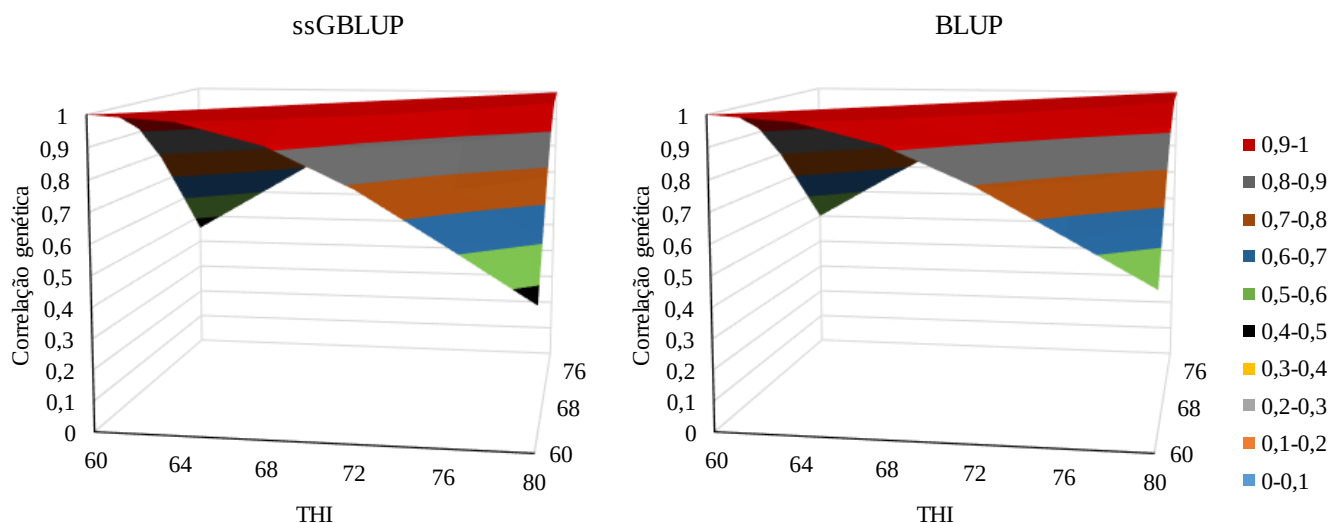


Figura 2. Médias *a posteriori* das correlações genéticas entre as estimativas de produção de leite no dia do controle para diferentes combinações de índice de temperatura e umidade (THI).

Em ambas as metodologias ssGBLUP e BLUP, o coeficiente de inclinação da norma de reação, que representa a capacidade dos animais em responder ao estresse calórico, apresentou variância genética aditiva superior à variância de ambiente permanente. Isso significa que a tolerância ao estresse calórico é mais genética do que ambiental, o que permite obter resposta à seleção. A inclusão de informações genômicas no modelo de norma de reação aumentou a variância genética dos termos de intercepto e inclinação cerca de 22 e 13%, respectivamente. Além disso, a inclusão das informações genômicas no modelo de norma de reação mostrou desvios-padrão mais baixos, ou seja, estimativas mais precisas foram obtidas. Isso ocorreu, pois, a inclusão das informações genômicas pelo método ssGBLUP pode ter reduzido o erro de predição devido à melhor estimativa dos coeficientes de parentesco. As razões inclinação/intercepto apresentaram valores semelhantes entre as duas metodologias, e indicam uma expressiva magnitude de interação G x E. A correlação genética entre o intercepto e a inclinação foi próxima de zero para a metodologia BLUP, indicando ausência de associação entre o nível geral de produção de leite e a capacidade de resposta ao estresse térmico. Já pela abordagem ssGBLUP, a correlação foi moderada e negativa, indicando que os animais com maiores níveis de produção tendem a apresentar menor tolerância ao estresse calórico. Esse aumento na correlação entre intercepto e inclinação com a inclusão de informações

genômicas sugere uma maior ocorrência de reclassificação dos animais quando avaliados em diferentes ambientes.

Tabela 1. Médias *a posteriori* e desvios-padrão (entre parênteses) da variância genética aditiva e de ambiente permanente dos parâmetros dos termos intercepto (L) e inclinação (S) do modelo de norma de reação estimados por meio de abordagens ssGBLUP e BLUP.

	ssGBLUP	BLUP
Efeitos genéticos aditivos		
L	1,65 (0,24)	1,35 (0,24)
S	0,17 (0,04)	0,15 (0,04)
Covariância L- S	-0,19 (0,06)	0,02 (0,06)
Correlação genética L - S	-0,35 (0,10)	0,05 (0,14)
Razão S/L	0,11 (0,03)	0,11 (0,04)
Efeitos de ambiente permanente		
L	2,98 (0,17)	3,32 (0,20)
S	0,01 (0,00)	0,02 (0,00)
Covariância L- S	0,11 (0,01)	-0,12 (0,01)
Correlação genética L - S	0,68 (0,03)	-0,51 (0,03)
Razão S/L	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

As diferentes sensibilidades dos animais às mudanças ambientais afetaram a distribuição dos valores genéticos ao longo da escala THI em ambas as análises (Figura 3). Importantes reclassificações podem ser observadas entre os diferentes ambientes térmicos, demonstrando a presença de interação G x E. Isso significa que importantes erros de seleção podem ocorrer devido às diferentes sensibilidades genéticas dos animais ao calor. Além disso, com a metodologia ssGBLUP foram observadas maiores reclassificações, conforme já indicado pelas estimativas de correlação genética (Figura 2). Isso pode ter ocorrido devido ao fato de os animais apresentarem maior conectividade entre os diferentes níveis de THI em comparação com o modelo BLUP. Incluir informações genômicas no modelo não melhora apenas os relacionamentos dos animais, mas também fornece uma melhor conexão genética impulsionada pelo grau de ligações genômicas entre os níveis de THI. De acordo com Hayes et al. (2016) com a inclusão de informações genômicas, melhora-se a estimativa da interação G x E, pois o viés é reduzido quando os animais genotipados são bem amostrados em todos os ambientes.

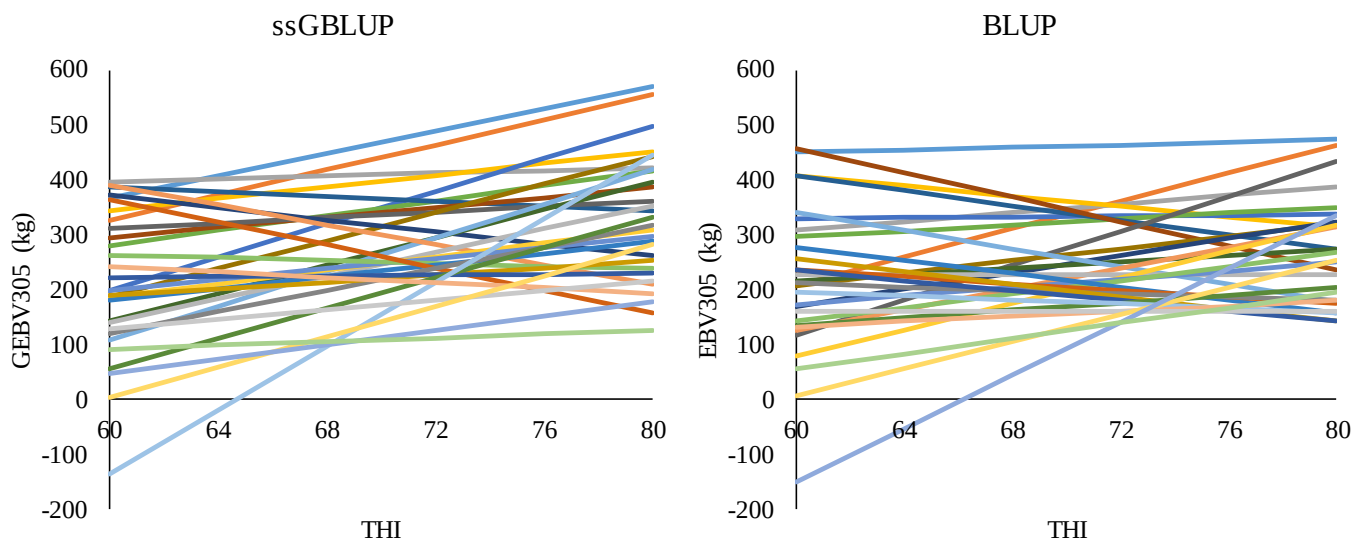


Figura 3. Padrão de resposta ao longo da escala do índice de temperature e umidade (THI) dos valores genéticos (EBV305) e genéticos-genômicos (GEBV305) estimados para produção de leite aos 305 dias (EBV305) dos 30 melhores touros (com no mínimo 10 filhas) classificados de acordo com EBV305 no THI = 72.

As correlações de Pearson entre os EBV305 e GEBV305 dos 85 touros mais utilizados nos rebanhos (Figura 4) mostram que importantes variações nas avaliações genéticas dos animais podem ocorrer com a inclusão de informações genômicas, principalmente quando são comparados THIs de valores extremos. Como um menor número de controles leiteiros está sendo coletado sob condições de THIs extremos, a inclusão de informações genômicas altera principalmente as estimativas nesses ambientes em comparação com a análise BLUP, causada pela melhor conexão genética entre os níveis de THI.

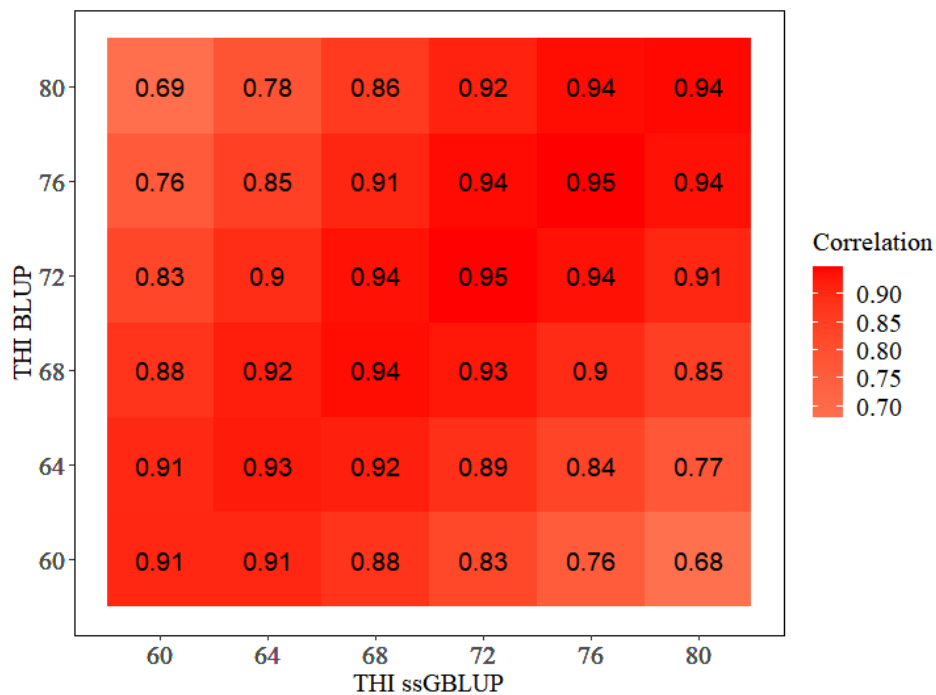


Figura 4. Correlações de Pearson entre os valores genéticos (EBV305) e genéticos-genômicos (GEBV305) para produção de leite até 305 dias de 85 touros com no mínimo 10 filhas.

De forma geral, as acurácias de predição obtidas pela abordagem BLUP para EBV305 diminuíram com o aumento nos valores de THI (Figura 5). A provável causa desse resultado é o reduzido número de fenótipos disponíveis em baixos valores de THI. Com isso, os valores genéticos nessa faixa de THI dependem mais das informações de parentesco, e consequentemente, há maior correlação entre as estimativas de EBV da validação com as obtidas pelo banco de dados completo. Já para os GEBV305 estimados por ssGBLUP, as acurácias se mantiveram constantes ao longo da escala THI, provavelmente pois a matriz H utilizada no ssGBLUP permite, através da relação genômica, explorar a similaridade entre indivíduos não relacionados pelo pedigree, melhorando a conexão genética entre os níveis de THI. Embora no geral o método BLUP tenha apresentado maiores acurácias, o método ssGBLUP gerou estimativas de GEBVs mais acuradas em THIs mais elevados, com valores de acurácia superando às do método BLUP em THIs maiores que 70. Uma vez que os rebanhos estudados estejam sendo criados predominantemente sob condições tropicais, com 72,5% dos controles leiteiros sendo coletados em THI superiores a 70, o método ssGBLUP pode representar uma alternativa adequada para a predição dos GEBV nos rebanhos estudados.

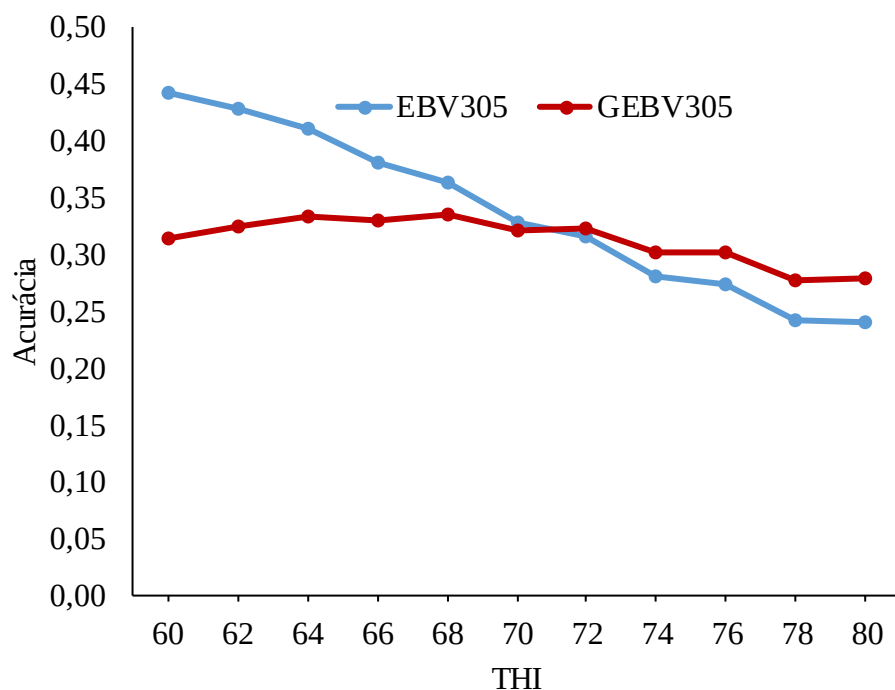


Figura 5. Acurácias das estimativas dos valores genéticos (EBV305) e genéticos-genômicos (GEBV305) para produção de leite aos 305 dias em diferentes índices de temperatura e umidade (THI).

A análise GWAS foi realizada para detectar regiões genômicas candidatas associadas ao termo linear do coeficiente de regressão, que representa a tolerância dos animais ao estresse calórico na produção de leite (Figura 6). No geral, a maioria das regiões genômicas explicou uma pequena ($< 1\%$) proporção da variância genética aditiva total, indicando que a tolerância ao estresse calórico é uma característica poligênica.

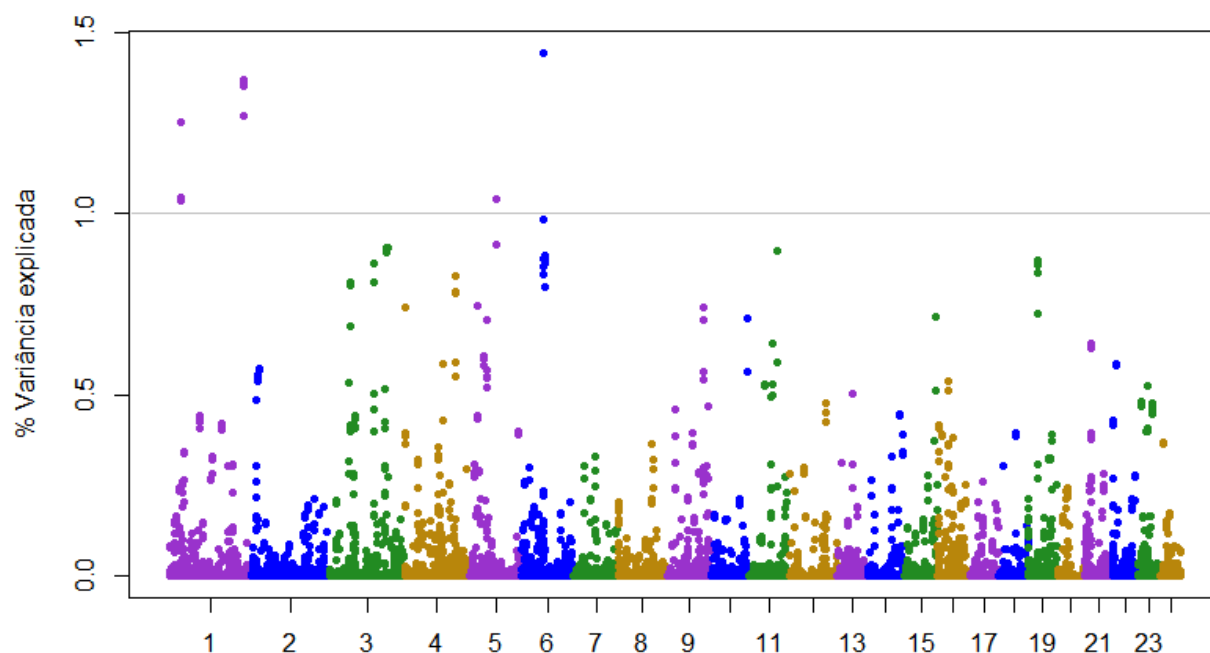


Figura 6. Porcentagem da variância genética aditiva do coeficiente de inclinação explicada por uma janela de 5 SNPs adjacentes para a produção de leite no dia do controle. No eixo x, as cores representam os cromossomos; o eixo y representa a contribuição dos marcadores; a linha horizontal cinza é o limiar (top 1,0%) para as regiões genômicas candidatas.

Os genes contidos nas regiões genômicas de maior importância estão descritos na Tabela 2. Interessantemente, alguns dos genes selecionados estão associados à resposta a hormônios, a estímulos endógenos e a estímulos externos. O ESRRG é um receptor de hormônio esteroide e desempenha um papel crítico na termogênese (Ahmadian et al., 2018). Gu et al. (2020) estudaram galinhas nativas da China e encontraram associação do ESRRG com a resposta a ambientes altamente estressantes (estresse térmico, vento árido e arenoso e radiação solar). O ESRRG também foi associado com características de produção de leite, identificado por chip de búfalos (De Camargo et al., 2015) e em chip de bovinos (Venturini et al., 2014). O gene LOC102401316, também chamado de MYL9, foi identificado em associação com animais extremamente ofegantes devido ao estresse térmico em vacas leiteiras da raça Jersey (Wang et al., 2021). Também foi associado aos efeitos imunomoduladores do estresse calórico em galinhas (Monson et al., 2018). O gene LOC102392178, também chamado de SH3BGRL3, foi identificado em associação com vacas tolerantes ao calor em resposta ao estresse calórico (Garner, 2017). O IGSF5 está associado a funções reprodutivas. Uma alteração no padrão de expressão do IGSF5 foi identificada em porcas prenhes sob estresse calórico (Seibert, 2018). De acordo com Zhao

et al. (2021) o estresse calórico afeta a eficiência placentária e a capacidade da placenta em suportar o crescimento fetal, e os autores também encontraram uma associação do IGSF5 com a função placentária em porcas sob estresse calórico. O PCP4 funciona como um modulador da ligação do cálcio pela calmodulina. Assim, regula a atividade da calmodulina e os diferentes processos que ela controla. A via de sinalização cálcio / calmodulina medeia a resposta ao estresse térmico e a aquisição de termotolerância em plantas (Wu & Jinn, 2012). Shahzad et al., 2015 identificaram uma associação entre o PCP4 e o efeito do estresse calórico em partos de vacas leiteiras ocorrendo no verão, indicando um maior estado inflamatório durante o estresse calórico. Apesar da importante contribuição do presente estudo em identificar genes candidatos, estudos futuros são necessários para explorar de maneira mais aprofundada as vias biológicas e funcionais destes genes, auxiliando a priorizar na seleção genômica as regiões candidatas que estão relevantemente associadas à tolerância ao estresse calórico na produção de leite de búfalas.

Tabela 2. Genes candidatos mapeados através do banco de dados NCBI para SNPs associados com a tolerância ao estresse calórico na produção de leite.

ID	Símbolo	Nome	Crom.	Pos. Inicial	Pos. Final
102393698	ESRRG	Receptor gama relacionado ao estrogênio	5	60724148	61418016
112585283	LOC112585283	Não caracterizado	5	60829111	60866752
112585410	TRNAC-ACA	Transferência ARN cisteína (anticodon ACA)	5	61015447	61015518
102392178	LOC102392178	Ácido glutâmico de ligação ao domínio SH3 rico em proteína	1	184095392	184171535
112586660	LOC112586660	Não caracterizado	1	184226779	184256279
102395407	LOC102395407	Não caracterizado	1	184232895	184240093
102395629	B3GALT5	beta-1,3-galactosiltransferase 5	1	184279283	184318251
102396557	IGSF5	Membro 5 da Superfamília de Imunoglobulinas	1	184393961	184448054
102397063	PCP4	Proteína 4 da célula de Purkinje	1	184505825	184572722
102411501	FRG1	gene 1 da região FSHD	1	26395523	26409563
112587455	LOC112587455	RNA nucleolar pequeno U2-30	1	26401246	26401318
112587456	LOC112587456	RNA nucleolar pequeno U2-19	1	26401452	26401531
112587490	LOC112587490	RNA nucleolar pequeno SNORA81	1	26630162	26630317
102415368	BCAR3	Proteína adaptadora BCAR3, membro da família NSP	6	49547993	49700908
112585621	LOC112585621	Não caracterizado	6	49693740	49701029
102415695	FNBP1L	Proteína 1 de ligação à formalina	6	49714736	49839300
112585912	LOC112585912	RNA spliceossômico U6	6	49753312	49753418
112585623	LOC112585623	Pseudogene L23a da proteína ribossômica 60S	6	49766701	49767207
112585622	LOC112585622	Pseudogene L9 da proteína ribossômica 60S	6	49803601	49804312
112585854	LOC112585854	RNA nucleolar pequeno SNORA16B/ família SNORA16A	6	49865716	49865848
102416237	DR1	Regulador repressor da transcrição 1	6	49878865	49900876
102401316	LOC102401316	Pseudogene de polipeptídeo de luz reguladora de miosina 9	6	49951657	49952552
102416561	CCDC18	domínio coiled-coil 18	6	49978486	50090546

5. Conclusão

O método ssGBLUP resultou em maiores estimativas de herdabilidade e variância genética aditiva, além de maiores acurácias em situações de estresse calórico e melhor modelagem da interação genótipo-ambiente devido ao estresse calórico na produção de leite de búfalas, representando uma alternativa adequada para prever os valores genéticos. Modelos que levam em consideração a interação $G \times E$ devem ser integrados aos atuais esquemas de seleção visando selecionar animais mais resistentes ao calor.

Vários genes foram identificados nas regiões genômicas candidatas, e estudos complementares são necessários para melhor explorar as vias biológicas e funcionais dos genes candidatos que afetam a tolerância ao estresse calórico na produção de leite.

6. Referências Bibliográficas

- Aguilar, I., Misztal, I., & Tsuruta, S. (2009). Genetic components of heat stress for dairy cattle with multiple lactations. *Journal of dairy science*, 92(11), 5702–5711.
- Aguilar, I., Misztal, I., & Tsuruta, S. (2010). Genetic trends of milk yield under heat stress for US Holsteins. *Journal of dairy science*, 93(4), 1754–1758.
- Aguilar, I., Misztal, I., Tsuruta, S., Legarra, A., & Wang, H. (2014). PREGSF90–POSTGSF90: Computational tools for the implementation of single-step genomic selection and genome-wide association with ungenotyped individuals in BLUPF90 programs. *10. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP)*.
- Ahmadian, M., Liu, S., Reilly, S. M., Hah, N., Fan, W., Yoshihara, E., Jha, P., De Magalhaes Filho, C. D., Jacinto, S., & Gomez, A. V. (2018). ERR γ preserves brown fat innate thermogenic activity. *Cell reports*, 22(11), 2849–2859.
- Aspilcueta-Borquis, R. R., Araujo Neto, F. R., Baldi, F., Santos, D. J., Albuquerque, L. G. de, & Tonhati, H. (2012). Genetic parameters for test-day yield of milk, fat and protein in buffaloes estimated by random regression models. *Journal of dairy research*, 272–279.
- Barros, D. V., Silva, L. K. X., de Brito Lourenço, J., da Silva, A. O. A., e Silva, A. G. M., Franco, I. M., Oliveira, C. M. C., Tholon, P., Martorano, L. G., & Garcia, A. R. (2015). Evaluation of thermal comfort, physiological, hematological, and seminal features of buffalo bulls in an artificial insemination station in a tropical environment. *Tropical animal health and production*, 47(5), 805–813.
- Behera, R., Chakravarty, A. K., Sahu, A., Kashyap, N., Rai, S., Dash, S., Upadhyaya, A., Singh, A., & Gupta, A. K. (2018). Identification of critical heat stress zone for energy corrected milk yield in Murrah buffaloes using temperature humidity index under subtropical climatic conditions. *Indian J Anim Sci*, 88(7), 838–841.
- Bernabucci, U., Biffani, S., Buggiotti, L., Vitali, A., Lacetera, N., & Nardone, A. (2014). The effects of heat stress in Italian Holstein dairy cattle. *Journal of dairy science*, 97(1), 471–486.
- Bohmanova, J., Misztal, I., Tsuruta, S., Norman, H. D., & Lawlor, T. J. (2008). Genotype by environment interaction due to heat stress. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 840–846.
- Brügemann, K., Gernand, E., König von Borstel, U., & König, S. (2012). Defining and evaluating heat stress thresholds in different dairy cow production systems. *Archiv Tierzucht*, 55, 13–24.
- Brügemann, K., Gernand, E., Von Borstel, U. U., & König, S. (2011). Genetic analyses of protein yield in dairy cows applying random regression models with time-dependent and temperature x humidity-dependent covariates. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4129–4139.
- Carabaño, M. J., Bachagha, K., Ramón, M., & Díaz, C. (2014). Modeling heat stress effect on Holstein cows under hot and dry conditions: Selection tools. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7889–7904.
- Choudhary, B. B., & Sirohi, S. (2019). Sensitivity of buffaloes (*Bubalus bubalis*) to heat stress. *Journal of Dairy Research*, 86(4), 399–405.
<https://doi.org/10.1017/S0022029919000773>

- Christensen, O. F., & Lund, M. S. (2009). Genomic relationship matrix when some animals are not genotyped. *Proc. 60th Annual Meeting EAAP, Barcelona, Spain. Wageningen Press, Wageningen, the Netherlands*, 299.
- da Silva, J. A. R., de Araújo, A. A., Júnior, J. de B. L., dos Santos, N. de F. A., Garcia, A. R., & de Oliveira, R. P. (2015). Thermal comfort indices of female Murrah buffaloes reared in the Eastern Amazon. *International journal of biometeorology*, 59(9), 1261–1267.
- Damasceno, F. A., Viana, J. M., & Gomes, R. C. C. (2010). *Adaptação De Bubalinos ao Ambiente Tropical*. 07(125), 14.
- Dash, S., Chakravarty, A. K., Singh, A., Upadhyay, A., Singh, M., & Yousuf, S. (2016). Effect of heat stress on reproductive performances of dairy cattle and buffaloes: A review. *Veterinary world*, 9(3), 235.
- De Camargo, G. M. F., Aspilcueta-Borquis, R. R., Fortes, M. R. S., Porto-Neto, R., Cardoso, D. F., Santos, D. J. A., Lehnert, S. A., Reverter, A., Moore, S. S., & Tonhati, H. (2015). Prospecting major genes in dairy buffaloes. *BMC genomics*, 16(1), 1–14.
- Garcia, A. R. (2013). Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Garner, J. B. (2017). *The physiology and functional genomics of the heat stress response in dairy cattle* [PhD Thesis].
- Garner, J. B., Douglas, M. L., Williams, S. R. O., Wales, W. J., Maret, L. C., Nguyen, T. T. T., Reich, C. M., & Hayes, B. J. (2016). Genomic Selection Improves Heat Tolerance in Dairy Cattle. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep34114>
- Geweke, J. (1991). *Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments* (Vol. 196). Federal Reserve Bank of Minneapolis, Research Department Minneapolis, MN.
- Gu, J., Liang, Q., Liu, C., & Li, S. (2020). Genomic analyses reveal adaptation to hot arid and harsh environments in native chickens of China. *Frontiers in genetics*, 11.
- Habeeb, A. A. M., El-Tarabany, A. A., Gad, A. E., & Atta, M. A. (2018). Negative effects of heat stress on physiological and immunity responses of farm animals. *Change*, 16(2.0), 0–2.
- Hammami, H., Bormann, J., M'hamdi, N., Montaldo, H. H., & Gengler, N. (2013). Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *Journal of dairy science*, 96(3), 1844–1855.
- Hayes, B. J., Daetwyler, H. D., & Goddard, M. E. (2016). Models for genome $\times$ environment interaction: Examples in livestock. *Crop Science*, 56(5), 2251–2259.
- Henderson, C. R. (1973). Sire evaluation and genetic trends. *Journal of Animal Science*, 1973(Symposium), 10–41.
- Hussain, A. M. (2016). The histological relationship between the environmental stress and milk production in Iraqi Buffaloes; *Bubalus bubalis*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(3), 19–22.
- IBGE. (2017). *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística—Resultados do Censo Agro 2017*.

https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75659

- Legarra, A., Aguilar, I., & Misztal, I. (2009). A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *Journal of dairy science*, 92(9), 4656–4663.
- Marai, I. F. M., & Haezeb, A. A. M. (2010). Buffalo's biological functions as affected by heat stress—A review. *Livestock Science*, 127(2), 89–109.
- Misztal, I., Legarra, A., & Aguilar, I. (2009). Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4648–4655.
- Misztal, I., Tsuruta, S., Strabel, T., Auvray, B., Druet, T., & Lee, D. H. (2002). BLUPF90 and related programs (BGF90). *Proceedings of the 7th world congress on genetics applied to livestock production*, 33, 743–744.
- Monson, M. S., Van Goor, A. G., Ashwell, C. M., Persia, M. E., Rothschild, M. F., Schmidt, C. J., & Lamont, S. J. (2018). Immunomodulatory effects of heat stress and lipopolysaccharide on the bursal transcriptome in two distinct chicken lines. *BMC genomics*, 19(1), 1–15.
- Morais Júnior, O. P., Duarte, J. B., Breseghello, F., Coelho, A. S., Morais, O. P., Júnior, M., & Ariano, M. (2018). Single-step reaction norm models for genomic prediction in multienvironment recurrent selection trials. *Crop Science*, 58(2), 592–607.
- Nasr, M. A. (2017). The potential effect of temperature-humidity index on productive and reproductive performance of buffaloes with different genotypes under hot conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–10.
- Nguyen, T. T. T., Bowman, P. J., Haile-Mariam, M., Pryce, J. E., & Hayes, B. J. (2016). Genomic selection for tolerance to heat stress in Australian dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 2849–2862. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9685>
- NRC. (1971). *National Research Council—A guide to environmental research on animals*. National Academies.
- Pawar, H. N., Kumar, G. R., & Narang, R. (2013). Effect of heat stress on milk production and composition in Murrah buffaloes. *Journal of Buffalo Science*, 2(2), 98.
- Peñagaricano, F., Weigel, K., Rosa, G. J., & Khatib, H. (2013). Inferring quantitative trait pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. *Frontiers in genetics*, 3, 307.
- Pragna, P., Archana, P. R., Aleena, J., Sejian, V., Krishnan, G., Bagath, M., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E. K., & Varma, G. (2017). Heat stress and dairy cow: Impact on both milk yield and composition. *Int. J. Dairy Sci*, 12(1), 1–11.
- Ravagnolo, O., & Misztal, I. (2000). Genetic component of heat stress in dairy cattle, parameter estimation. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 2126–2130.
- Santana, M. L., Bignardi, A. B., Pereira, R. J., Stefani, G., & El Faro, L. (2017). Genetics of heat tolerance for milk yield and quality in Holsteins. *animal*, 11(1), 4–14.
- Santana, M. L., Pereira, R. J., Bignardi, A. B., Vercesi Filho, A. E., Menendez-Buxadera, A., & El Faro, L. (2015). Detrimental effect of selection for milk yield on genetic tolerance

to heat stress in purebred Zebu cattle: Genetic parameters and trends. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 9035–9043.

Seibert, J. T. (2018). *Investigating the interplay of physiological and molecular mechanisms underpinning programmable aspects of heat stress in pigs* [PhD Thesis]. Iowa State University.

Shahzad, K., Akbar, H., Vailati-Riboni, M., Basirico, L., Morera, P., Rodriguez-Zas, S. L., Nardone, A., Bernabucci, U., & Loor, J. J. (2015). The effect of calving in the summer on the hepatic transcriptome of Holstein cows during the peripartal period. *Journal of dairy science*, 98(8), 5401–5413.

VanRaden, P. M. (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of dairy science*, 91(11), 4414–4423.

Venturini, G. C., Cardoso, D. F., Baldi, F., Freitas, A. C., Aspilcueta-Borquis, R. R., Santos, D. J. A., Camargo, G. M. F., Stafuzza, N. B., Albuquerque, L. G., & Tonhati, H. (2014). Association between single-nucleotide polymorphisms and milk production traits in buffalo. *Genet. Mol. Res*, 13(4), 10256–10268.

Vitezica, Z. G., Aguilar, I., & Legarra, A. (2010). One Step vs. Multi Step Methods For Genomic Prediction in Presence Of Selection. *9th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. Leipzig, Germany*.

Wang, H., Misztal, I., Aguilar, I., Legarra, A., Fernando, R. L., Vitezica, Z., Okimoto, R., Wing, T., Hawken, R., & Muir, W. M. (2014). Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Frontiers in Genetics*, 5, 134.

Wang, H., Misztal, I., Aguilar, I., Legarra, A., & Muir, W. M. (2012). Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genetics Research*, 94(2), 73–83.

Wang, J., Xiang, Y., Jiang, S., Li, H., Caviezel, F., Katawatin, S., & Duangjinda, M. (2021). Involvement of the VEGF signaling pathway in immunosuppression and hypoxia stress: Analysis of mRNA expression in lymphocytes mediating panting in Jersey cattle under heat stress. *BMC veterinary research*, 17(1), 1–14.

Wu, H.-C., & Jinn, T.-L. (2012). Oscillation regulation of Ca²⁺/calmodulin and heat-stress related genes in response to heat stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant signaling & behavior*, 7(9), 1056–1057.

Zhang, X., Lourenco, D., Aguilar, I., Legarra, A., & Misztal, I. (2016). Weighting strategies for single-step genomic BLUP: An iterative approach for accurate calculation of GEBV and GWAS. *Frontiers in genetics*, 7, 151.

Zhao, W., Liu, F., Marth, C. D., Green, M. P., Le, H. H., Leury, B. J., Bell, A. W., Dunshea, F. R., & Cottrell, J. J. (2021). Maternal Heat Stress Alters Expression of Genes Associated with Nutrient Transport Activity and Metabolism in Female Placentae from Mid-Gestating Pigs. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4147.