



Funciones del óxido nítrico en la respuesta de la planta a la toxicidad por cadmio

A. Rodríguez-González¹, L.C. Terrón-Camero¹, M. C. Romero-Puertas^{1,*}.

(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Apartado 419, E-18080, Granada, España.

* Autor de correspondencia: M.C. Romero Puertas [maria.romero@eez.csic.es].

> Recibido el 24 de enero de 2020 - Aceptado el 23 de junio de 2020

Rodríguez-González, A., Terrón-Camero, L.C., Romero-Puertas, M.C. 2020. Funciones del óxido nítrico en la respuesta de la planta a la toxicidad por cadmio. *Ecosistemas* 29(2):1935. Doi.: 10.7818/ECOS.1935

La actividad humana del último siglo ha conllevado un aumento de la contaminación del suelo por metales pesados, entre ellos el cadmio (Cd), uno de los más tóxicos. Su entrada en el suelo, fundamentalmente por el uso de fertilizantes y actividades como la minería, y su absorción por las plantas lo introduce en la cadena trófica. El Cd es un elemento no esencial para las plantas, pero entra a las mismas a través de transportadores de metales esenciales compitiendo con éstos. La exposición al Cd afecta a numerosos procesos fisiológicos y metabólicos en la planta provocando una reducción en el crecimiento y productividad de la misma, y causa clorosis y estrés oxidativo debido a una mayor producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Recientemente, el óxido nítrico (NO) se ha relacionado con la respuesta de la planta al estrés por Cd, pero los mecanismos en los que está involucrado no se conocen exactamente. En este trabajo se revisan las fuentes de contaminación, los mecanismos de toxicidad por Cd y las funciones del NO en la respuesta de la planta al Cd. Se concluye que el NO aplicado de forma exógena suele proteger a la planta por inducción del sistema antioxidante. Como molécula endógena, el NO se ha relacionado con la regulación a través de modificaciones postraduccionales de proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo, hormonas y factores de transcripción. Es necesario comprender las interacciones plantas - metales para establecer programas de crecimiento de especies de interés agrícola con menor absorción de metales.

Palabras clave: contaminación; estrés oxidativo; hiperacumulación; fitorremediación; tolerancia

Rodríguez-González, A., Terrón-Camero, L.C., Romero-Puertas, M.C. 2020. Nitric oxide functions in plant response to cadmium toxicity. *Ecosistemas* 29(2):1935. Doi.: 10.7818/ECOS.1935

Human activities have led to environmental pollution with heavy metals, including cadmium (Cd) which is one of the most toxic pollutants. Cd is released into the environment by mining and fertilizers application. Metal uptake by crop plants introduces Cd into the human food chain, posing to a human health concern. Although Cd is not an essential element, it can enter the roots and it is translocated throughout different tissues by a variety of unspecific transport systems, thereby competing with essential nutrients. Cadmium exposure affects numerous physiological and biochemical processes in plants and leads to limited growth and therefore yield chlorosis, and oxidative stress induced by the production of reactive oxygen species (ROS). Recently, the well-known signalling molecule, nitric oxide (NO), has been involved in plant response to Cd toxicity, although NO-dependent mechanisms are not fully characterized. In this review, the main sources for Cd contamination and the mechanisms involved in metal toxicity are discussed including the possible NO roles in plant response to this heavy metal. NO applied exogenously usually protects the plant mainly by induction of the antioxidant system. As an endogenous molecule, NO has been involved in the regulation of proteins related to oxidative metabolism, hormones, and transcription factors through posttranslational modifications.

Key words: contamination; oxidative stress; hyperaccumulation; phytoremediation; tolerance

El cadmio: fuentes de contaminación

Químicamente hablando, los metales pesados se refieren a metales y metaloides que poseen una masa atómica mayor de 20 y gravedad específica mayor de 5 g/cm³ (Wuana y Okieimen 2011; Terrón-Camero et al. 2019). Sin embargo, desde una perspectiva biológica, se refiere a estos metales pesados como aquellos que incluso a bajas concentraciones resultan tóxicos (Rascio y Navariz 2011; Li et al. 2019). Los metales pesados se pueden dividir en dos grupos principales: (I) elementos como el boro (B), cobre (Cu), hierro (Fe), molibdeno (Mo), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn), esenciales para el crecimiento de la planta, pero tóxicos cuando su concentración excede ciertos umbrales; y (II) elementos como el arsénico (As, un metaloide), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y

plomo (Pb), que no son esenciales para las plantas o animales (Gupta et al. 2010; Andresen et al. 2018; Edelstein y Ben-Hur 2018). La contaminación de suelos por metales pesados se ha convertido en un problema medioambiental que despierta un gran interés debido al impacto negativo que tiene sobre la economía, el cual se estima en 10 billones de dólares por año. Globalmente se han descrito 500 millones de hectáreas de suelo, en 5 millones de localizaciones diferentes, con polución por metales y metaloides (He et al. 2015; Li et al. 2019).

El Cd fue inicialmente descubierto como una impureza del carbonato de Zn, es un elemento de transición del grupo IIB, con número atómico 48, masa atómica 112.4, densidad 8.65 g/cm³, temperatura de fusión y ebullición de 320.9°C y 765°C respectivamente (Wuana y Okieimen 2011) y con una abundancia de 0.15

mg/kg en la corteza terrestre y 0.11 µg/L en el mar. Es relativamente inestable y, por tanto, el Cd se suele encontrar en la naturaleza combinado con Cl, S y O formando óxidos, sulfuros y carbonatos, en minerales de Zn, Cu y Pb. El Cd también se puede unir a otros compuestos como aminoácidos, citrato, oxalato, salicilato y ácidos húmicos y fúlvicos (Hayes 2016; Fristachi y Choudhury 2017; Zhang y Reynolds 2019).

Las fuentes de contaminación por Cd pueden ser antropogénicas o naturales (Fig. 1). Las principales fuentes antropogénicas engloban la agricultura, la industria, la minería, el transporte, el consumo de carburantes y las aguas residuales (Edelstein y Ben-Hur 2018). La aplicación de fertilizantes fosfatados introduce inadvertidamente Cd y otros elementos químicos potencialmente tóxicos como el flúor (F), Hg o Pb, al suelo. Además, el Cd se libera principalmente de baterías Ni-Cd, estabilizado de plásticos, combustión de fósiles, incineración de residuos y por el empleo de pinturas en las cubiertas para proteger vehículos y navíos de condiciones ambientales exigentes (Wuana y Okieimen 2011). Por otro lado, la minería de Zn, Pb y Cu, la producción no ferrosa de metales y la producción de cemento también contribuyen a la entrada de Cd en el medio. El consumo global de Cd se estima en 20 000 – 40 000 t/año (UNEP 2010). El abandono de las áreas relacionadas con la actividad minera tiene un impacto negativo sobre el desarrollo ambiental y económico, afectando a la calidad del suelo, aire e involucrando la cadena alimentaria (García-Gómez et al. 2014; Sanz-Fernández et al. 2017). Se ha encontrado Cd en muchos alimentos analizados como cereales o vegetales, frutos y tubérculos con concentraciones que varían desde los 0.01 a 0.05 mg/kg de peso seco (Romero-Puertas et al. 2019).

Por otro lado, las mayores fuentes de contaminación natural de metales pesados son el movimiento de polvo en suspensión, la emisión de partículas vulcanogénicas, los incendios forestales y pulverizados de sales marinas (Edelstein y Ben-Hur 2018). La UNEP estimó la emisión natural de Cd en 25 000 – 88 000 t/año en 2010, mucho mayor que las emisiones antropogénicas (UNEP 2010; Rahman y Singh 2019). Algunos metales como el Cd y el Pb o metaloides como el As, se pueden volatilizar a elevadas temperaturas convirtiéndose en óxidos y condensándose como finas partículas en ambientes no reductores. El índice de transporte de un metal pesado en el suelo depende de la forma química y especiación del metal (Wuana y Okieimen 2011). Una vez en el suelo, los metales se adsorben por reacciones iniciales rápidas y lentas re-

distribuyéndose en diferentes formas químicas, variando la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad. Se sabe que la distribución de los metales ocurre por reacciones como la precipitación y disolución, intercambio iónico, adsorción y desorción, formación de complejos acuosos, movilización o inmovilización biológica y entrada en organismos (Wuana y Okieimen 2011). Predominantemente, el Cd existe como CdO, CdCO₃, CdS y CdCl₂ durante días en la atmósfera. En agua sin embargo, se encuentra como formas solubles: Cd²⁺, Cd(OH)₂ y CdCO₃ (UNEP 2010; ATSDR 2012; Rahman y Singh 2019). Naturalmente el Cd acuoso proviene de la deposición del Cd atmosférico, la disolución de Cd sólido (minerales) y erosión de la roca madre y sedimentos del suelo (Nagajyoti et al. 2010; Mason 2013; Zhang y Reynolds 2019).

El cadmio en la cadena trófica

Las fuentes principales de exposición a Cd para humanos son la cadena trófica, el trabajo en la industria y el tabaco. Las fuentes fundamentales de Cd en una dieta son productos básicos como el trigo, arroz y las patatas, aunque también se puede hallar en productos derivados del cacao, invertebrados marinos y algas (EFSA 2012). El contenido de Cd en plantas crecidas en suelos contaminados es marcadamente superior a pH 4.0 que a pH 5.0 y las concentraciones de Cd extractables son mayores en suelos arenosos que en suelos arcillosos (Ismael et al. 2019).

Entrada del Cd en la planta

El Cd puede entrar a la hoja a través de los estomas, roturas cuticulares, poros acuosos y ectodesmos o lenticelas (Edelstein y Ben-Hur 2018). El metal se mueve a la raíz de la planta con dependencia del pH y del contenido en materia orgánica, entre otros factores. Posteriormente, se puede inmovilizar generando carbonatos, sulfatos o precipitados de fosfato a lo largo de la vía apoplástica o simplástica (Edelstein y Ben-Hur 2018).

En primer lugar, el Cd en forma iónica, a partir de la solución del suelo, entra a la planta gracias a los grupos funcionales y con independencia del pH en la pared celular de las raíces. Esto ocurre sin necesidad de energía y espontáneamente, debido a interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del metal y los grupos carboxilo de las paredes celulares en el apoplasto de la raíz. Por otro lado, hay un transporte más lento que depende de la especie vegetal y de la concentración de iones metálicos en el suelo que

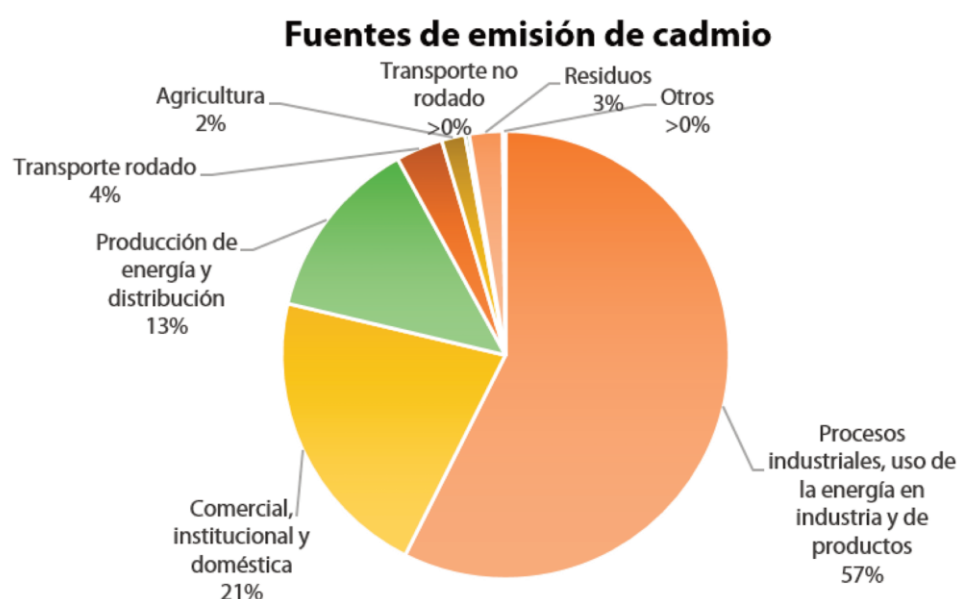


Figura 1. Representación gráfica del impacto que presentan diversas fuentes antropogénicas en la emisión de Cd (European Environmental Agency 2019).

Figure 1. Graphical display of the impact that different anthropogenic Cd sources have on Cd emission (European Environmental Agency 2019).

es la actividad metabólica de entrada simplástica (Meychik y Yermakov 2001; Ismael et al. 2019). Mientras que los iones o moléculas cargadas normalmente requieren canales específicos para entrar al organismo, los complejos con carga neutra tienen propiedades químicas similares a compuestos orgánicos o especies no iónicas, pudiendo moverse a través de las membranas celulares por difusión pasiva (Mason 2013; Zhang y Reynolds 2019).

El Cd está entre los elementos que se puede acumular en plantas con niveles por encima de 0.01% del peso seco de la parte aérea sin causar síntomas de toxicidad (McGrath y Zhao 2003). Los metales no esenciales como el Cd, pueden entrar a las células de la planta a través de sistemas de transporte que intervienen en la entrada de micronutrientes. En concreto, el Cd^{2+} entra a través de transportadores transmembrana relacionados con la entrada de calcio (Ca^{2+}), Fe^{2+} , magnesio (Mg^{2+}), Cu^{2+} y Zn^{2+} . De hecho, algunos de estos metales pueden inhibir la entrada de Cd desde la solución de la rizosfera o su acumulación en raíces de las plantas. Los niveles de Ca afectan a la entrada de Cd porque este compete con el Ca por sus transportadores. Una baja concentración externa de Ca incrementa la entrada de Cd, pudiendo resultar tóxico. Además, se ha visto una aparente deficiencia de Zn bajo exposición por Cd al poder entrar a través de sus transportadores, como ZnT (*Zinc Transporter*; Gallego et al. 2012).

Así, se ha descrito que el Cd puede entrar a la raíz a través de diferentes transportadores (Terrón-Camero et al. 2019):

- Familia ZIP, la cual toma su nombre de sus primeros componentes descritos, “*Zinc-Regulated Transporter*” e “*Iron-Regulated Transporter like Protein*” (IRT), que pueden transportar metales del espacio extracelular o del lumen al citoplasma. IRT1, aunque se ha descrito principalmente como transportador de Fe, puede transportar otros cationes divalentes como son el Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} siendo el primero de la familia en ser descrito (Vert et al. 2002).
- Familia YSL o “*Yellow-Stripe Like*”. Estos forman parte de transportadores de oligopéptidos y se relacionan con el transporte de complejos metal-nicotinamina a través de la membrana plasmática (Bellegghem et al. 2007). Las plantas incrementan la movilidad de los iones mediante la excreción de ligandos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido mugineico y, en consecuencia, exponen a sus raíces a un aumento en la disponibilidad del Cd. Por lo tanto, cuando el Cd se acompleja, las plantas lo pueden tomar a través de proteínas YSL (Curie et al. 2009).
- Familia NRAMP, conocidos como transportadores de metales unidos a protón o “*Natural Resistance-Associated Macrophage Proteins*”. También se conocen por DCT1 (“*Divalent Cation-Transporter 1*”) o DMT (“*Divalent Metal Transporter 1*”), con un amplio rango de sustratos (Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) y diferentes funciones en diferentes especies. Se ha descrito que los transportadores de Arabidopsis, AtNRAMP1 y de arroz, OsNRAMP5; localizados en la membrana plasmática y transportadores de Mn y Fe, podrían participar en la entrada de Cd a la raíz (Cailliatte et al. 2009).
- Canales y otras proteínas relacionadas con la entrada de Cd. El Cd también puede entrar en el simplasto de la planta por transporte pasivo. Las metalo-chaperonas son proteínas clave para el transporte seguro de iones metálicos dentro de la célula. Las más comunes son las isopreniladas asociadas a metales pesados (HPP/HIPP), que se relacionan con la homeostasis del metal, mecanismos de detoxificación, especialmente relacionados con la tolerancia al Cd (De Abreu-Neto et al. 2013).

Transporte y almacenamiento de Cd dentro de la planta

La retención del Cd en las células de la raíz se puede lograr por moléculas que forman quelatos, como las fitoquelatinas, por secuestro vacuolar o por barreras apoplásticas (Fig. 2). El transporte de Cd al xilema radicular ocurre vía apoplástica o simplástica controlada por sitios de control específicos en el córtex radicular. Su carga al xilema está mediada por $\text{P}_{1\text{B}}\text{-ATPas}$ de metales pesados

como los ortólogos AtHMA2 y AtHMA4 y posiblemente por el YSL. El Cd también se puede translocar al tonoplasto por antiportadores $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ como los ortólogos de AtCAX2 y AtCAX4. Además, el metal quelado se puede transferir por transportadores ABC como los ortólogos AtMRP3 (Korenkov et al. 2007; Dalcorsio et al. 2008; Ismael et al. 2019).

Entre los mecanismos de flujo de metales en Arabidopsis, hay transportadores relacionados con la redistribución de Cd, translocación y detoxificación como los codificados por los genes *PCR1* y *PCR2* (“*Plant Cadmium Resistance*”). *PCR1* incrementa la tolerancia al mismo, exportándolo fuera de la célula y disminuyendo su contenido. Además, el transportador MATE (“*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*”), miembro de las familias ABC, se ha descrito como regulador de la detoxificación de Cd, exportándolo fuera del citoplasma (Ismael et al. 2019). También hay otros transportadores como los VIT1 (“*Vacuolar Iron Transporter*”) que se relacionan con el transporte de Fe, Cd y Mn a la vacuola (Terrón-Camero et al. 2019). Los transportadores de Fe, AtNRAMP3 y AtNRAMP4, encargados de regular los niveles de Fe en la vacuola, también pueden transportar Cd por lo que podrían controlar los niveles de Cd en la vacuola (Thomine et al. 2000). Por otro lado, el transportador de Mn, AtNRAMP6, también parece tener una función relacionada con la localización intracelular del Cd, viéndose afectada la distribución de este metal en la célula cuando se alteran los niveles de este transportador (Cailliatte et al. 2010).

Toxicidad del cadmio

El progreso tecnológico y la industrialización durante el siglo XX estuvieron asociados a un incremento del uso del Cd, resultando en un incremento en su concentración y distribución en el entorno y generando un peligro para la salud de humanos y animales (Satarug et al. 2010; UNEP 2010; Mezynska y Brzóska 2018). La exposición a Cd afecta a la salud humana en niveles celulares y a menudo se correlaciona con el estrés oxidativo y el daño al DNA. El Cd celular influye en muchas proteínas y sus funciones en la célula, y por tanto, puede inhibir la síntesis de DNA y causar roturas de forma dependiente de la exposición (Zhang y Reynolds 2019). Estudios epidemiológicos proporcionan pruebas de que una exposición durante tiempos prolongados, normalmente en zonas industrializadas, genera carcinomas, riesgo de daños renales, hepáticos, en el sistema esquelético y cardiovascular, así como en la vista y oído (EFSA 2012; Wu et al. 2014; Wang et al. 2016; Satarug et al. 2017; Mezynska y Brzóska 2018). De hecho, el Cd se caracteriza por la fuerte acumulación en organismos vivos, proporcional a la edad. Una vez en el organismo, se une a proteínas en las membranas del eritrocito y se transporta hasta el hígado, en donde se liberan los iones Cd^{2+} que inducen la síntesis de metalotioneínas (MT; Sabolić et al. 2010; Mezynska y Brzóska 2018). Estos complejos Cd-MT se degradan en los túbulos renales para liberar Cd y aminoácidos, que serán reabsorbidos (Satarug et al. 2017).

Por otro lado, la toxicidad por Cd afecta negativamente a la fisiología de las plantas, interfiriendo con varios procesos como la formación del tubo polínico y germinación del polen, generando menos semillas y afectando a la viabilidad de las mismas al disminuir el nivel de enzimas hidrolíticas y movilización del almidón (Huybrechts et al. 2019). Otros efectos descritos en la planta son una actividad mitótica anormal (Ismael et al. 2019) o la alteración de la estructura de la membrana y su permeabilidad además de alterar las relaciones hídricas así como la entrada y distribución de micro y macronutrientes, un retraso del crecimiento e inhibición de la fotosíntesis llevando a la pérdida de rendimiento (Gupta et al. 2017; Romero-Puertas et al. 2019). Las plantas tratadas con CdCl_2 mostraron síntomas de toxicidad, incluyendo marchitamiento, decoloración de hojas con puntos cloróticos y necróticos y ennegrecimiento de raíces (Nagajyoti et al. 2010). Además, el Cd induce efectos perniciosos en la fotosíntesis con alteración de la ultraestructura del cloroplasto y biosíntesis de clorofila, fotofosforilación, transporte electrónico y

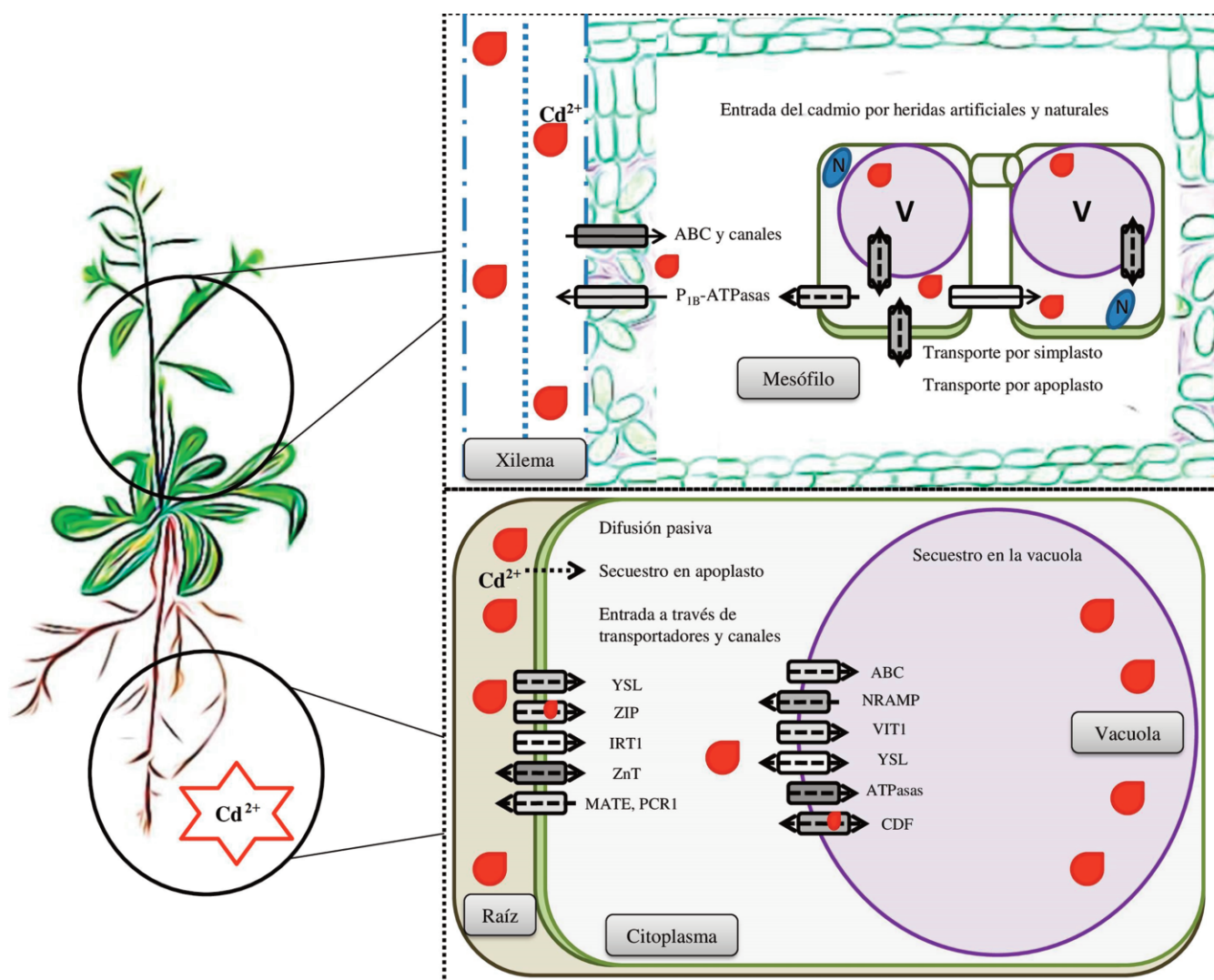


Figura 2. Recorrido del cadmio desde su entrada a las células radiculares, su traslocación y transporte hasta las células del mesófilo de la hoja. Abreviaturas: ABC (ATP binding cassette), CDF (cation diffusion facilitator), IRT1 (iron related transporter 1), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), N (núcleo), NRAMP (natural resistance-associated macrophage proteins), PCR1 (plant cadmium resistance), V (vacuola), VIT1 (vacuolar iron transporter), YSL (yellow-stripe like), ZIP (ZRT- and IRT-like protein) y ZnT (zinc transporter).

Figure 2. Route of cadmium from its entry into the root cells, translocation and transport to the mesophyll cells of the leaf. Abbreviations: ABC (ATP binding cassette), CDF (cation diffusion facilitator), IRT1 (iron related transporter 1), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), N (nucleus), NRAMP (natural resistance-associated macrophage proteins), PCR1 (plant cadmium resistance), V (vacuole), VIT1 (vacuolar iron transporter), YSL (yellow-stripe like), ZIP (ZRT- and IRT-like protein) and ZnT (zinc transporter).

Ciclo de Calvin (Nagajyoti et al. 2010; Zhang y Reynolds 2019). La disminución del contenido de nutrientes, fundamentalmente de Fe y Ca y la inhibición de la asimilación del NO_3^- causan una disminución específica del crecimiento reflejado en la biomasa aérea y radicular (Romero-Puertas et al. 2019).

La fitotoxicidad inducida por el Cd se relaciona con su capacidad para unirse a grupos tiol, histidilo y carboxilo de enzimas y proteínas estructurales interfiriendo con su función. Además, el Cd puede comprometer esta funcionalidad al sustituir los iones esenciales de los centros activos de las enzimas debido a la similitud química que presentan con la de otros iones divalentes (Huybrechts et al. 2019). Además de producir roturas en las cadenas de ADN, el Cd induce la formación de micro-núcleos y aberraciones cromosómicas (Vral et al. 2011). Estos daños desencadenan efectos importantes en el crecimiento de la planta, influenciando el ciclo celular o induciendo la muerte celular programada. Sin embargo, esta misma capacidad para unirse a los grupos hidroxilo, tiol y carboxilo hace que parte del Cd se quede anclado en la pared celular. De hecho, para prevenir la entrada de Cd al citoplasma celular, la estructura de la pared celular queda alterada tras la exposición al metal, dependiendo de su concentración y el lugar donde se acumule. Las pectinas, unos componentes principales de la pared ce-

lular vegetal, contienen grupos funcionales como el hidroxilo, tiol y carboxilo, que permiten su unión a iones trivalentes y divalentes como el Cd^{2+} . La exposición a Cd incrementa la desmetilesterificación de pectinas, lo que genera un mayor número de sitios de unión de este ión a las pectinas y además, incrementa la lignificación mediada por peroxidases (POX), aumentando la rigidez de la pared y limitando la entrada del metal al citoplasma (Gutsch et al. 2018; Huybrechts et al. 2019).

Mecanismos de tolerancia al estrés por cadmio

El GSH (glutathión), con grupos funcionales tiol libres en cisteínas, es el compuesto más abundante y está ampliamente distribuido, dentro de la célula. El Cd tiene gran afinidad de unión por los grupos tiol de GSH y de la fitoquelatina sintasa (PCS). Esta unión resulta en una activación de la PCS dando lugar a la polimerización de GSH para generar fitoquelatinas (PCs; Jozefczak et al. 2015). En plantas, la respuesta antioxidante fundamentalmente se basa en el uso y reciclaje de GSH y ascorbato (AsA) complementado por la SOD (superóxido dismutasa) y CAT (catalasa). Las SOD constituyen el primer mecanismo de defensa contra el radical superóxido (O_2^- ; Jozefczak et al. 2015).

Incluso la forma y volumen de la vacuola tienen una función clave en la detoxificación del Cd. Hay cambios en la permeabilidad para prevenir el transporte de metales pesados a través de la membrana plasmática y una inducción del flujo de salida de iones metálicos por transportadores como ATPasas, NRAMPs, CDFs y ZIPs. Además, se ha demostrado que la planta evita el crecimiento hacia suelos contaminados, recientemente demostrado en el mutante *Cd-phobic MRC-22*, capaz de parar el crecimiento de una raíz primaria afectada por Cd y de inducir raíces secundarias hacia una zona sin Cd (ver revisión [Romero-Puertas et al. 2019](#)).

Curiosamente, las plantas micorrizadas son más tolerantes a los metales pesados, ya que los hongos micorrícicos pueden retener metales pesados en las raíces y prevenir su translocación a la parte aérea de la planta, aunque las defensas microbianas antioxidantes pueden ser responsables también de la mayor tolerancia a metales pesados ([Ferrol et al. 2016](#); [Zhang et al. 2018](#); [Terrón-Camero et al. 2019](#)).

Si las estrategias descritas anteriormente fallan, la planta activa respuestas defensivas que consisten en la inducción de proteínas de choque térmico (HSP), prolina, poliaminas, hormonas y moléculas señalizadoras ([Terrón-Camero et al. 2019](#)).

Estrés oxidativo inducido por Cd

En las plantas, diferentes compartimentos subcelulares producen continuamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros ROS como subproducto de varias reacciones metabólicas. Mientras que la mayoría de las especies de oxígeno reactivo (ROS) dentro de la célula vegetal se generan en cloroplastos y peroxisomas, las mitocondrias son los principales productores de ROS en ausencia de luz y en tejidos no fotosintéticos ([Navrot et al. 2007](#)). En cloroplastos y mitocondrias, la fuga de electrones al oxígeno como consecuencia de la sobre-reducción de la cadena de transporte electrónico (CTE) puede generar radicales superóxido que posteriormente forman H_2O_2 . En peroxisomas, este se puede producir directamente por reacciones de oxidación de ácidos grasos y glicolato formado durante la fotorrespiración. Por otro lado, los ROS se pueden generar enzimáticamente en el apoplasto, en la membrana plasmática por las NADPH oxidasas. Además, en un ambiente fuertemente reductor las enzimas que eliminan H_2O_2 pueden llegar a producirlo ([Cuyper et al. 2016](#)). Aunque hay numerosos estudios que indican las NADPH oxidasas como principales productores de ROS, hay autores que han cuestionado esto y señalan que esa acumulación de ROS procede desde la mitocondria ([Heyno et al. 2008](#)). Curiosamente, se ha demostrado que las NADPH oxidasas podrían tener una función importante regulando la entrada y el transporte de nutrientes de la raíz al tallo en *Arabidopsis* en respuesta a Cd, aunque el mecanismo aún se desconoce ([Gupta et al. 2017](#); [Romero-Puertas et al. 2019](#)).

La elevada vida media del H_2O_2 , un milisegundo, y su pequeño tamaño le permite atravesar membranas celulares y migrar en diferentes compartimentos, permitiendo su función como molécula señalizadora. Actualmente se conoce que es una molécula reguladora de procesos fisiológicos como la adquisición de resistencia ([Lee y Hwang 2005](#)), fortificación de la pared celular y producción de fitoalexinas ([Levine et al. 1994](#)), senescencia ([Pastori y del Río 1997](#)), muerte celular programada ([Bethke y Jones 2001](#)), fotosíntesis ([Foyer 2018](#)), apertura estomática ([Bright et al. 2006](#)) y ciclo celular ([Slesak et al. 2007](#)). Sin embargo, se requiere un control muy estricto de su concentración ya que a elevadas concentraciones supone un riesgo para la célula. La principal fuente de producción en la célula son las NADPH oxidasas y la reducción del radical superóxido por la SOD ([Petrov y Breusegem 2012](#)). Se ha observado que la pre-aclimatación con H_2O_2 reduce las consecuencias negativas de la exposición al metal mientras que estimula los mecanismos defensivos de la planta ([Cuyper et al. 2016](#)).

Uno de los principales mecanismos por los que el Cd ejerce su función tóxica es el estrés oxidativo. Aunque como se ha indicado anteriormente, este metal no puede inducir la generación de ROS y radicales libres directamente por su naturaleza redox inactiva, es

capaz de estimular su producción indirecta, principalmente debilitando barreras enzimáticas y no enzimáticas ([Mezynska y Brzóska 2018](#)). El término ROS engloba especies radicales y no radicales de oxígeno que derivan del metabolismo aerobio de la reducción del oxígeno. En los últimos años se ha reconocido que un bajo nivel de ROS y RNS (especies de nitrógeno reactivo) tienen una importante función en la red señalizadora en respuesta de las plantas al estrés ([Romero-Puertas et al. 2019](#)). El desequilibrio en el contenido de ROS y defensas antioxidantes o estrés oxidativo va a venir determinado por 1) la capacidad del Cd para sustituir al Fe en varias proteínas, incrementando los niveles libres de Fe, que es capaz de participar en reacciones de tipo Fenton – Haber Weiss; 2) la disminución del contenido celular de defensas antioxidantes no enzimáticas como el GSH e incremento de la síntesis de fitoquelatinas; 3) la inhibición de enzimas involucradas en mecanismos de defensa antioxidante y generación de ROS a través de enzimas como la NADPH oxidasa ([Cuyper et al. 2010](#); [Huybrechts et al. 2019](#); [Romero-Puertas et al. 2019](#)).

Una de las modificaciones proteicas oxidativas más comunes es la carbonilación o formación derivada de carbonilos que genera una modificación irreversible que conlleva a la pérdida de función y promueve la degradación de las proteínas. La peroxidación lipídica es otro marcador común del estrés oxidativo que afecta a la estructura y funcionalidad de las membranas biológicas ([Romero-Puertas et al. 2019](#)). Como se ha comentado anteriormente, el Cd provoca un desequilibrio nutricional, por tanto, disminuye la concentración efectiva de Ca celular, afectando tanto a las defensas antioxidantes, como la actividad SOD y a rutas dependientes de calmodulina. Mientras que los ROS modulan los niveles citosólicos de Ca a través de la activación de sus canales transportadores, la producción de $O_2^{\cdot-}$ por la NADPH oxidasa depende del Ca ([Cuyper et al. 2016](#)).

Para prevenir estos daños las plantas tienen una maquinaria enzimática como la SOD, CAT o POX (peroxidasa) además de la no enzimática que incluye al GSH, al ascorbato, a los carotenoides y al α -tocoferol además de los ciclos que los involucra, como son el sistema de peroxirredoxinas, tioredoxinas, glutarredoxinas y el ciclo ascorbato-glutatión. Por otro lado, la exposición al Cd también afecta a la regulación y actuación de las fitohormonas ([Møller et al. 2007](#); [Bücker-neto et al. 2017](#); [Huybrechts et al. 2019](#)).

El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso capaz de difundir a través de membranas. En los últimos 20 años, el NO se ha relacionado con la regulación de multitud de procesos fisiológicos y pato-fisiológicos en plantas incluyendo procesos de desarrollo como la germinación ([Correa-Aragunde et al. 2004](#); [Albertos et al. 2015](#)) y floración ([Seligman et al. 2008](#)), la organogénesis de raíces ([Pagnussat et al. 2003](#)), la formación de raíces adventicias ([Pagnussat et al. 2003](#)), desarrollo de raíces laterales ([Correa-Aragunde et al. 2004](#)) y formación de pelos radiculares ([Lombardo et al. 2006](#)) o bien la respuesta a metales pesados ([Terrón-Camero et al. 2019](#)) y senescencia ([Mishina et al. 2007](#)). Una de las primeras funciones asignadas al NO está relacionada con la respuesta defensiva, incluyendo la muerte celular programada ([Delledonne et al. 1998](#); [Durner et al. 1998](#); [Mur et al. 2013](#)). Recientemente, se ha descrito también una función para el NO en las interacciones beneficiosas planta-microorganismo ([Cánovas et al. 2016](#); [Martínez-Medina et al. 2019](#)). El NO es altamente reactivo y se puede unir a metales, oxígeno molecular y radical superóxido. También puede reaccionar con los grupos funcionales de azufre y nitrógeno presentes en las biomoléculas ([Astier et al. 2018](#)). Las moléculas derivadas de la reducción del NO y reacción con ROS como el peroxinitrito, se engloban bajo el término RNS ([Terrón-Camero et al. 2019](#)).

Metabolismo del NO

El estado de oxidación intermedio del nitrógeno en el NO, entre las abundantes formas fuertemente oxidadas como el nitrato o el nitrito y las formas completamente reducidas como el amonio, per-

miten a la planta producir NO por 2 vías principalmente: la vía oxidativa y la vía reductiva (Fig. 3; Astier et al. 2018; León y Costa-Broseta 2019).

Vías reductivas: estas se clasifican tanto en enzimáticas como en no enzimáticas y son dependientes de la concentración de oxígeno y nitrato en el medio de reacción. La nitrato reductasa (NR) es una enzima multifuncional citoplasmática involucrada en la asimilación y metabolismo del nitrógeno. Es responsable del primer paso limitante de la asimilación del nitrato, catalizando su conversión a nitrito mediante el uso del NADPH como donante de electrones en condiciones de normoxia y dependencia del pH. El complejo homodimérico activo requiere la presencia de una molibdopterina, un grupo hemo y FAD. En *Arabidopsis* la actividad catalítica NR viene determinada por los genes *NIA1* y *NIA2* (Fruingillo et al. 2015). Aunque ambas isoformas pueden emplear nitrito o nitrato como sustrato, *NIA2* tiene una mayor actividad nitrato reductasa mientras que *NIA1* es más eficiente como nitrito reductasa (Mohn et al. 2019). Como se mencionó anteriormente, además de la actividad NR primaria, esta enzima ha sido descrita con la actividad nitrito:NO reductasa (Ni:NOR). Esta segunda reacción es relativamente baja y representa solo 1% de la capacidad reductora de la NR en condiciones normales (Astier et al. 2018). La Ni:NOR, una nitrito reductasa asociada a la membrana, se localiza en raíces y produce NO a partir de nitrito en el apoplasto de las células usando NADPH como donante de electrones. Es dependiente de la concentración parcial de O_2 y funciona junto a una NR unida a la membrana apoplástica que transforma el nitrato en nitrito (Astier et al. 2018).

Además de los mecanismos arriba descritos, el NO se puede producir a partir de nitrito a través de otras enzimas dependientes del cofactor Mo *in vitro* o de la acción de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en plantas. Esta reacción se localiza en la membrana de la mitocondria involucrando principalmente a los complejos III y IV. Curiosamente, esta producción de NO ocurre en condiciones de normoxia y no se inhibe por nitrato, en contraste a la actividad Ni:NOR. También se puede dar la reducción del nitrito como aceptor final de electrones en condiciones anóxicas en la mitocondria por la oxidasa alternativa (AOX). Aunque permanece sin confirmar en plantas superiores, se ha revelado en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, que la NR puede interactuar con la proteína “nitric oxide-forming nitrite reductase” (NOFNiR), para producir NO a partir de nitrito en una reacción dependiente de NAD(P)H y usando electrones proporcionados por la actividad diaforasa de la NR. NOFNiR pertenece a la familia de componentes reductores de la amidoxima mitocondrial (ARC). Tanto la NR como la NOFNiR requieren el cofactor Mo, además de otras enzimas que dependen de este cofactor, como son la aldehído oxidasa (AO), la sulfito oxidasa (SO) y la xantina oxidasa (XO; Astier et al. 2018; Astier et al. 2019; Kumari et al. 2019; León y Costa-Broseta 2019).

La reducción de nitritos a NO puede suceder no enzimáticamente en condiciones particulares como entornos reductores o a bajo pH y alta concentración de nitrato; situación que puede ocurrir en la capa de la aleurona y en el apoplasto (Astier et al. 2018).

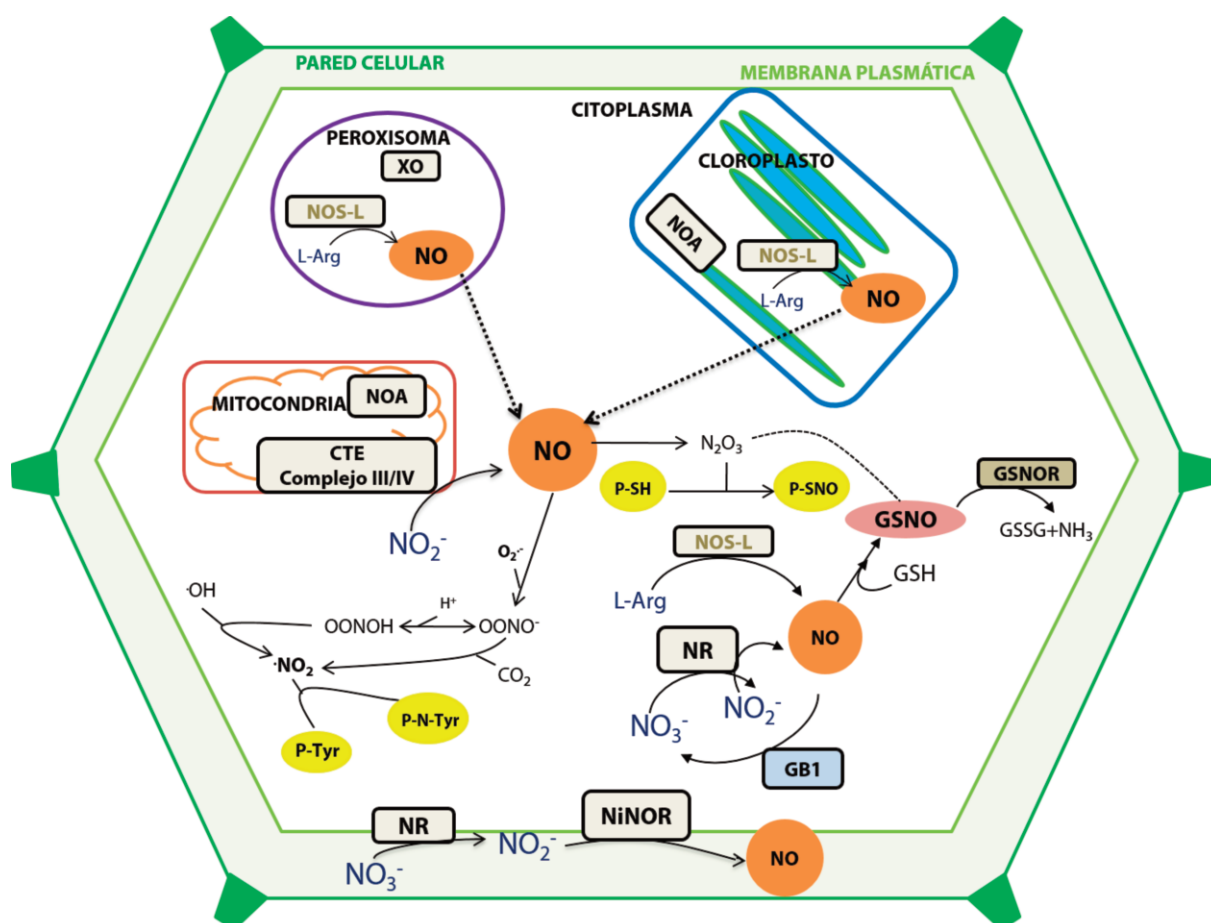


Figura 3. Representación esquemática de las vías de producción y metabolismo del óxido nítrico en plantas. Abreviaturas: CTE (cadena de transporte electrónico mitocondrial), GB1 (hemoglobina no simbiótica 1), GSH (glutatión), GSNO (S-nitrosoglutatión), GSNOR (S-nitrosoglutatión reductasa), L-Arg (L-arginina), NiNOR (nitrito:NO reductasa), NR (nitrato reductasa), NO (óxido nítrico), NOS-L (óxido nítrico sintasa-like), NOA (NO-associated protein), P-SH (grupo tiol de una proteína), P-SNO (proteína S-nitrosilada), P-Tyr (residuo tirosina de una proteína), P-N-Tyr (proteína nitrada) y XO (xantina oxidasa).

Figure 3. Schematic representation of the sources and metabolism of nitric oxide in plants. Abbreviations: CTE (mitochondrial electron transport chain), GB1 (non-symbiotic hemoglobin 1), GSH (glutathione), GSNO (S-nitrosoglutathione), GSNOR (S-nitrosoglutathione reductase), L-Arg (L-arginine), NiNOR (nitrite:NO reductase), NR (nitrate reductase), NO (nitric oxide), NOS-L (nitric oxide synthase-like), NOA (NO-associated protein), P-SH (thiol group of a protein), P-SNO (S-nitrosylated protein), P-Tyr (tyrosine of a protein), P-N-Tyr: (nitrated protein) and XO (xanthine oxidase).

Vía oxidativa: en animales, la producción de NO es principalmente dependiente de una familia multienzimática, la óxido nítrico sintasa (NOS). Las NOSs catalizan la formación de L-citrulina y NO a partir de L-arginina, a través de una doble mono-oxigenación (Hancock y Neill 2019). En plantas sin embargo, hay asociada una producción de NO a L-arginina y NADPH, la cual se conoce como NOS-like, cuya localización se ha propuesto en peroxisomas y cloroplastos, si bien no se ha encontrado en plantas superiores un gen ortólogo al gen de la NOS animal (Corpas y Barroso 2014; Astier et al. 2018). Además, hay una GTPasa codificada por *NOA1* ("NO-associated protein 1") que parece contribuir indirectamente a la producción de NO en respuesta a ácido abscísico (Bruckdorfer 2005; Fancy et al. 2017). Se ha propuesto otro sustrato potencial para la vía oxidativa de síntesis de NO que es la hidroxilamina. Sin embargo en plantas y cianobacterias esta parece reducirse por hemoglobina de tipo 1 en condiciones de hipoxia (Sturms et al. 2011; León y Costa-Broseta 2019).

Los niveles de NO tienen que estar estrictamente regulados para lograr un balance en condiciones normales en la célula, ya que un exceso de NO puede resultar tóxico (Fig. 3). El NO puede reaccionar con GSH para producir S-nitrosoglutatión (GSNO), el cual se considera un reservorio de NO, y una molécula menos reactiva que el propio NO (Liu et al. 2001). El GSNO es el SNO (S-nitrosotiol) de bajo peso molecular más abundante (Liu et al. 2018). La enzima S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR), la cual metaboliza GSNO y se regula por nitrosotioles, genera NH_4^+ y GSH dimerizado y es dependiente de NADPH. La GSNOR regula indirectamente los niveles de NO (Xu et al. 2013). La enzima conserva un bucle de autorregulación, por lo que es diana de S-nitrosilación, la unión covalente del grupo NO al sulfhidrilo libre de una cisteína (Zhan et al. 2018).

El NO también se regula a través de su oxidación a nitrato por hemoglobinas no simbióticas o fitoglobinas, reguladas por nitrosilación y S-nitrosilación y que son reducidas a Fe(II)HB y NO dioxigenado (Chamizo-ampudia et al. 2017; León y Costa-Broseta 2019). El NO también reacciona rápidamente con oxígeno molecular para originar nitratos y nitritos así como con el radical superóxido para formar peroxinitrito (ONOO $^-$; Fig. 3).

Función del NO en la respuesta de la planta al estrés por cadmio

Producción de NO en respuesta al cadmio

En los últimos años, se ha descrito tanto la producción como la posible función del NO en la respuesta de la planta frente al estrés por Cd. Se ha observado que la producción de NO depende de la dosis del metal, tiempo de tratamiento y especie (Romero-Puertas et al. 2019). Los resultados publicados indican que hay un pico inicial de NO, que podría estar asociado a señalización, mientras que a tiempos más largos hay una disminución de la producción (Romero-Puertas et al. 2019). En *Arabidopsis*, la concentración de NO decrece según aumenta la concentración de Cd de 25 a 100 μM así como el tiempo de exposición desde horas a días (Gupta et al. 2017; Terrón-Camero et al. 2019).

La mayoría de los estudios realizados sugieren que la actividad NOS-I es la principal fuente de producción de NO en respuesta a metales pesados, la cual se ve afectada por una deficiencia de Ca (Rodríguez-Serrano et al. 2009), si bien en algunos casos se ha descrito a la NR como fuente de NO (Terrón-Camero et al. 2019), lo que podría indicar que posiblemente esté involucrada más de una fuente de NO en la respuesta de la planta a este estrés. La percepción del estrés por Cd requiere una cascada de señalización que incluye al Ca, RNS y ROS con función señalizadora. Según la concentración de Cd aplicada, los estados fisiológicos de la planta pueden virar desde el desarrollo normal hasta el daño celular que conlleve a su muerte. En la respuesta al metal, es importante garantizar un equilibrio entre los mecanismos de producción y eliminación de ROS y RNS, ya que a altas concentraciones generan daños en la planta mientras que a bajas desarrollan diversas fun-

ciones, entre las que se incluye la regulación de la transcripción de genes relacionados con la respuesta y adaptación de la planta al Cd (Fig. 4).

Función protectora del NO como molécula exógena

Se ha descrito que la aplicación exógena de donadores de NO, como el nitroprusiato de sodio (SNP) podría aliviar la toxicidad por Cd y el estrés oxidativo en muchas especies vegetales. En estos estudios se ha observado que en la mayoría de ellos el NO incrementa los sistemas antioxidantes aumentando la actividad de enzimas antioxidantes como la CAT, glutatión peroxidasa (GPX) y ascorbato peroxidasa (APX); y la acumulación de antioxidantes no enzimáticos, como el GSH y Asc (Terrón-Camero et al. 2019). En algunos casos sin embargo, como el de *Typha angustifolia*, se ha propuesto que el NO puede reducir la toxicidad del Cd a través del incremento en el contenido de antioxidantes no enzimáticos, como el Asc, mientras que la defensa antioxidante enzimática permanece sin afectarse (Zhao et al. 2016; Romero-Puertas et al. 2019). Por otro lado, se ha descrito que el NO exógeno puede incrementar la tolerancia al Cd en plantas de arroz, al incrementar el contenido de pectinas y hemicelulosas en la pared celular y al disminuir el contenido de Cd en la fracción soluble celular de las hojas (Xiong et al. 2009; Romero-Puertas et al. 2019).

Función del NO como molécula endógena

El principal mecanismo de acción del NO es la modificación postraduccional (PTMs) de proteínas. Las PTMs dependientes de NO mejor conocidas son: 1) S-nitrosilación o S-nitrosación, que es la incorporación de un grupo NO en el sulfhidrilo de una cisteína (Jaffrey y Snyder 2001), menos estudiada la incorporación de un grupo NO en una amina (Zhao et al. 2007); 2) nitración, que es la incorporación de un grupo NO_2 en una tirosina (Ferrer-Sueta et al. 2018), menos estudiada la incorporación de un grupo NO_2 en fenilalanina o triptófano (Kaur et al. 1997; Barry et al. 2012) y 3) nitrosilación, que es la unión del NO a un metal como el Fe de un grupo hemo (Gow et al. 2004). A través de estas PTMs, el NO puede regular otras rutas de señalización como la fosforilación, oxidación y la incorporación de ubiquitinas a proteínas para su posterior degradación. Además, regula mediante PTMs la expresión génica por modificación de factores de transcripción; y la biosíntesis y señalización hormonal (Hess y Stamler 2012; León y Costa-Broseta 2019; Sánchez-Vicente et al. 2019). En la respuesta al estrés por metales pesados y en particular a Cd, no son muchas las investigaciones que se han llevado a cabo para la identificación de dianas de PTMs dependientes de NO. Un estudio realizado en peroxisomas de hojas de guisante sometidas a estrés por Cd identificó seis proteínas diana de S-nitrosilación relacionadas con la fotorrespiración, la β -oxidación y la eliminación de ROS. También se observó que los patrones de S-nitrosilación de dos de estas enzimas, CAT (enzima antioxidante) y glicolato oxidasa (GOX; enzima productora de H_2O_2), cambiaban en respuesta a Cd sugiriendo que existía una regulación de la molécula señal H_2O_2 por NO (Ortega-Galisteo et al. 2012). Por otro lado, también se ha descrito la S-nitrosilación de fitoquelatinas en respuesta a Cd, afectando por tanto a su capacidad para secuestrar el metal (De Michele et al. 2009). Además, en raíces de soja tratadas con Cd no se observaron cambios en los niveles totales de nitración de proteínas sugiriendo que la regulación por nitración podría ser una regulación de determinadas proteínas más que grandes cambios en los patrones de nitración (Pérez-Chaca et al. 2014). Un estudio posterior identificó proteínas nitradas en plantas de soja tratadas con Cd, estando relacionadas en su mayoría con proteólisis (Gzyl et al. 2016).

En plantas, la producción endógena de NO inducida por Cd debe ser estrictamente controlada ya que un exceso de NO podría contribuir a su toxicidad. El NO incrementa la entrada de Cd en raíces de *Arabidopsis* y la producción de NO se relacionó con la inhibición del crecimiento radicular desencadenado por Cd (Beson-Bard et al. 2009; Hu et al. 2019). Así, se ha demostrado que el Cd en el medio induce una represión del transportador regulador de Fe *IRT1* ("Iron Regulated Transporter 1"), se ha sugerido que

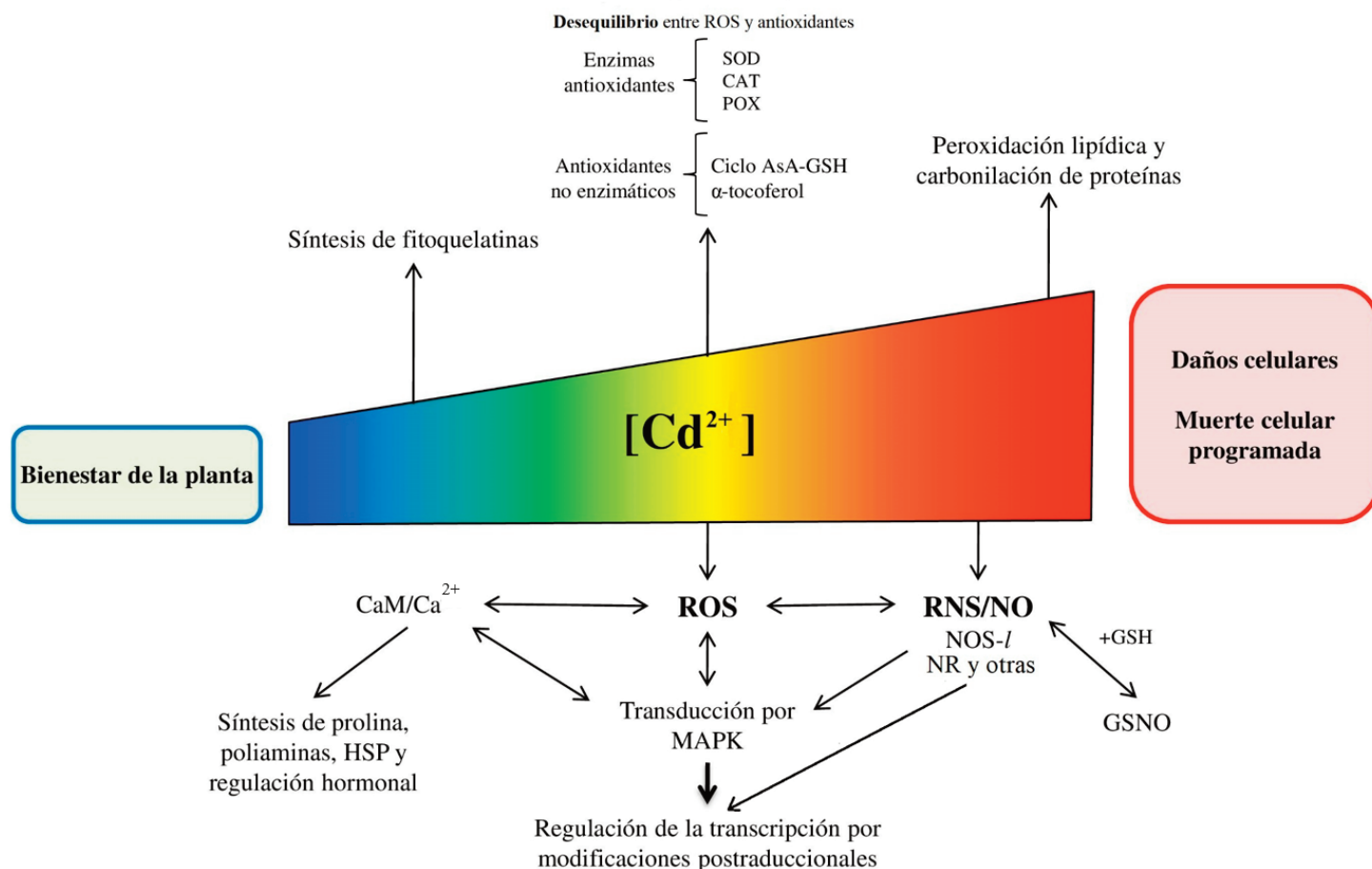


Figura 4. Representación esquemática de la evolución del estado redox durante la exposición de la planta al estrés por Cd y las respuestas que se generan en las plantas. Se produce una respuesta inicial de síntesis de fitoquelatinas, y una posterior inducción de los sistemas antioxidantes, según se van incrementando los niveles de ROS. Finalmente, un exceso de ROS provoca daños oxidativos en membranas y proteínas que pueden llevar a la muerte de la planta si estos daños no son controlados. Abreviaturas: AsA (ácido ascórbico), CaM (calmodulina), [Cd²⁺] (concentración de cadmio), CAT (catalasa), GSH (glutathión), GSNO (S-nitrosoglutathión), HSP (heat shock protein), NO (óxido nítrico), NOS-I (nitric oxide synthase-like), POX (peroxidasa), RNS (especies reactivas de nitrógeno), ROS (especies reactivas de oxígeno) y SOD (superóxido dismutasa).

Figura 4. Schematic representation of the evolution of the redox state during plant exposure to Cd stress and the responses generated in plants. An initial synthesis of phytochelatin occurs, and a subsequent induction of antioxidant systems, as ROS levels increase. Finally, an excess of ROS causes oxidative damage to membranes and proteins that can lead to the death of the plant if these damages are not controlled. Abbreviations: AsA (ascorbic acid), CaM (calmodulin), [Cd²⁺] (cadmium concentration), CAT (catalase), GSH (glutathione), GSNO (S-nitrosoglutathione), HSP (heat shock protein), NO (nitric oxide), NOS-I (nitric oxide synthase-like), POX (peroxidase), RNS (reactive nitrogen species), ROS (reactive oxygen species) y SOD (superoxide dismutase).

para evitar la entrada inespecífica de Cd. Se ha demostrado que el NO induce la expresión de *IRT1* y que, si se reducen los niveles de NO, la entrada de Cd a la planta se ve también disminuida indicando que un exceso de NO podría estar implicado en la entrada de Cd a la planta (Besson-Bard et al. 2009). También se ha observado una interferencia del Cd en la entrada de Ca, causando disminución en la entrada de Ca en las raíces. Esta disminución, es dependiente de NO (Besson-Bard et al. 2009). El mecanismo por el cual el NO regula la entrada de Ca aún no está claro, pero se ha sugerido que podría favorecer la entrada de Cd frente al Ca o la salida de Ca frente al Cd a través de la regulación de canales y/o transportadores de Ca (Fodor et al. 2005; Courtois et al. 2008; Besson-Bard et al. 2009). Recientemente, se ha demostrado que es necesario mantener niveles de NO bajos en plántulas germinadas en Cd para una mayor tolerancia y mantenimiento del sistema antioxidante (Terrón-Camero et al. 2020). También se ha descrito que el NO puede regular a través de diversas PTMs, tanto las enzimas productoras de ROS como antioxidantes en plantas de guisante en respuesta a Cd (Ortega-Galisteo et al. 2012), y proteólisis en soja (Gzyl et al. 2016).

Aplicabilidad en fitorremediación

Como los metales pesados no se degradan, y a pesar de la implementación de medidas para reducir la emisión de Cd a entornos

naturales, las predicciones indican que la exposición de la población general a este metal en países desarrollados aumentará en las próximas décadas, comprometiendo la salud (Satarug et al. 2010; UNEP 2010). La fitorremediación es una parte de la biorremediación que emplea plantas y su microbiota asociada para reducir la concentración o los efectos tóxicos de los contaminantes en el entorno (Kong y Glick 2017; Li et al. 2019). Una mayor comprensión de los mecanismos moleculares de la respuesta de la planta al metal, entrada en la planta, retención en la raíz, translocación y carga en los frutos podría facilitar el desarrollo de cultivos que almacenen menos Cd si éstos son para alimentación, y de plantas sobre-accumuladoras para fitorremediar suelos y restaurar la cubierta vegetal (Romero-Puertas et al. 2019). Así, la recuperación de suelos contaminados con vegetación es una buena estrategia para resolver este problema, por su bajo coste ambiental. Además, la cubierta vegetal evita la erosión del suelo y acumula parte de sus metales pesados. Aunque sería de utilidad conocer cómo se adquieren y metabolizan los metales pesados, aún no se han identificado todos los genes relacionados con la tolerancia o hiperacumulación (Pilon-smits 2005; Sanz-Fernández et al. 2017). El diseño de plantas con suficiente biomasa que sobreexpresen genes (como factores de transcripción y transportadores específicos) junto con los últimos avances en técnicas genómicas permitirán la reducción del coste y aumentarán la eficacia en el proceso de fitorremediación de entornos contaminados (Pilon-smits 2005).

Los mecanismos de tolerancia se relacionan con los procesos de entrada, partición y acumulación de metales tóxicos. La tolerancia de un organismo frente a Cd depende tanto del secuestro como de la eliminación de este metal, procesos que reducen la biodisponibilidad de iones metálicos tóxicos absorbidos y su interacción con moléculas presentes en la célula. Ambas estrategias involucran la síntesis de proteínas que forman quelatos o de bajo peso molecular que actúan como tampones intracelulares para metales e interactores de proteínas de transporte mediando su eliminación. La vacuola es el destino final para prácticamente todas las sustancias tóxicas a las que se expone la planta a través de transportadores como CDF ("Cation Diffusion Facilitator"), también denominado MTP (Clemens 2006).

El término hiperacumulador se adjudica a plantas que a diferencia de las plantas exclusoras, toman activamente cantidades extraordinarias de algún metal pesado del suelo. Además, los metales pesados no se retienen en las raíces sino que se translocan a la parte aérea en concentraciones cientos o miles de veces superiores a aquellas encontradas en especies no hiperacumuladoras y que no muestran síntomas de toxicidad; y es que la hiperacumulación radica en la hipertolerancia, clave para evitar la toxicidad por metales pesados (Reeves 2006; Rascio y Navari-Izzo 2011). *A. halleri*, *S. alfredii*, *Thlaspi caerulescens* y *T. praecox*, junto a la recientemente notificada *Solanum nigrum*, son las cinco especies que hiperacumulan Cd, además de otros metales como el Zn (Sun et al. 2006; Rascio y Navari-Izzo 2011). Los caracteres comunes son: mayor habilidad para obtener metales pesados del suelo, una translocación rápida y efectiva de la raíz al tallo y una mayor habilidad para detoxificar y secuestrar grandes cantidades de metales pesados en las hojas (Rascio y Navari-Izzo 2011). Un análisis comparativo de transcriptomas

entre especies relacionadas de hiperacumuladoras y no hiperacumuladoras ha demostrado que la capacidad para el secuestro radica en parte en la sobreexpresión constitutiva de genes, que en este caso, codifican proteínas que operan en la transferencia de metales pesados a través del tonoplasto y/o membrana plasmática (Rascio y Navari-Izzo 2011).

La detoxificación de metales pesados en hiperacumuladoras, en contraposición a las plantas no hiperacumuladoras no radica en ligandos de elevada masa molecular como las fitoquelatinas ya que el coste de las grandes cantidades de azufre y energía que se requieren es prohibitivo. La sobreexpresión de genes relacionados con la defensa antioxidante, así como incrementos de la síntesis de glutatión como molécula basal, ocurre en hiperacumuladoras como estrategia para reforzar el sistema celular antioxidante y sobrellevar el incremento de ROS (Schat 2002; Van De Mortel et al. 2008; Rascio y Navari-Izzo 2011). Las especies hiperacumuladoras de Cd tienen una gran habilidad para soportar la acumulación de ROS y el estrés oxidativo asociado a un aumento en la concentración de Cd en el ambiente. La exposición al metal incrementa dramáticamente los niveles de H_2O_2 en las raíces de *Nicotiana tabacum*, pero no en las raíces de la hiperacumuladora *Noccaea caerulescens*. Y esta habilidad podría estar asociada con una mayor actividad CAT constitutiva en *N. caerulescens* (unas 300 veces) que en *N. tabacum* (Hu et al. 2019).

Conclusiones y Perspectivas futuras

En los últimos años se han descrito la función del NO en la respuesta de la planta a la toxicidad por Cd y su posible función en la tolerancia al mismo (Fig. 5). Aunque se observa un incremento ini-

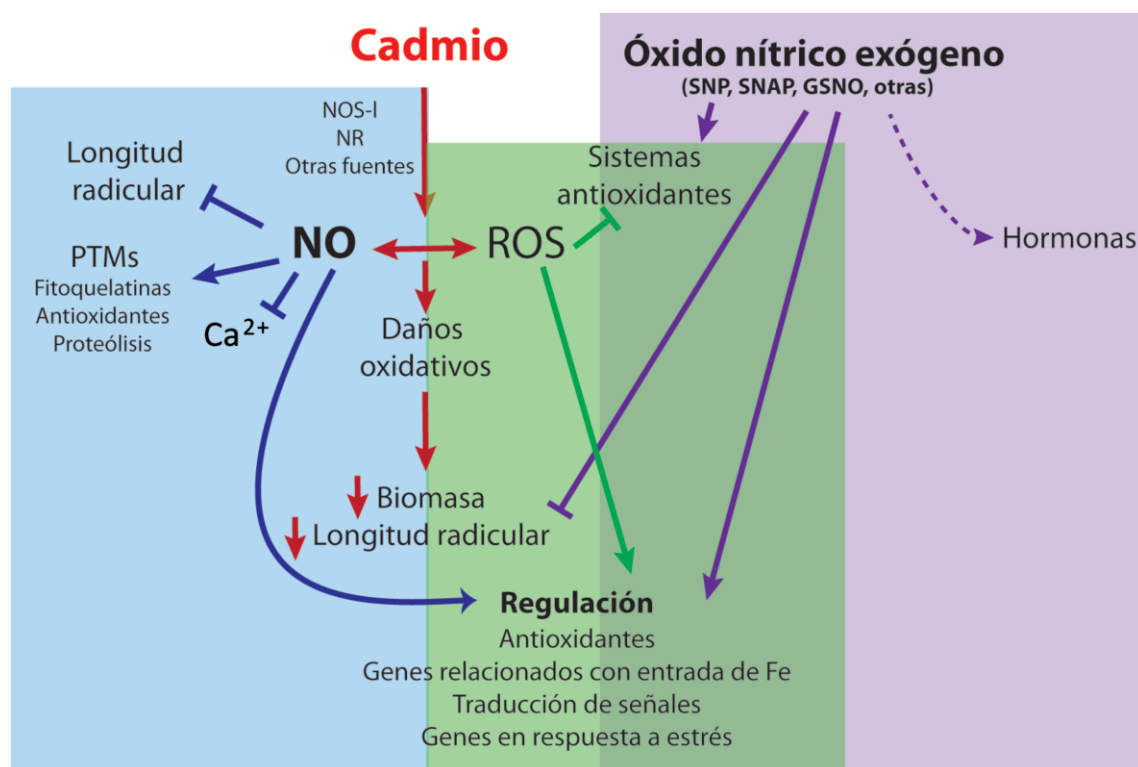


Figura 5. Esquema representativo de la función del NO en la respuesta de la planta a la toxicidad por Cd. El NO se ha relacionado con la entrada de Cd en la planta a través de transportadores de Fe principalmente, e inhibición de la entrada de Ca, con la reducción del crecimiento de la raíz e inhibición de los sistemas antioxidantes y fitoquelatinas a través de modificaciones postraduccionales (PTMs). Cuando el NO se suplementa de forma exógena, éste tiene un efecto protector frente a los daños oxidativos e inhibición del crecimiento causados por el metal. Como molécula señalizadora está relacionado con la inducción de sistemas antioxidantes, y traducción de señales que necesitan un mayor estudio.

Figure 5. Representative scheme of the role of NO in the plant response to Cd toxicity. NO has been involved in Cd uptake by the plant mainly through Fe transporters, and in the inhibition of Ca uptake; with the reduction of root growth and inhibition of antioxidant systems and phytochelatin synthesis through post-translational modifications (PTMs). When NO is supplemented exogenously, it has a protective effect against oxidative damage and growth inhibition caused by the metal. As a signalling molecule, it is involved in the induction of antioxidant systems, and the translation of signals that need further study.

cial en la producción de NO, éste debe ser controlado a tiempos más largos ya que está relacionado con la entrada de Cd en la planta, con la reducción del crecimiento de la raíz e inhibición de los sistemas antioxidantes y fitoquelatinas a través de modificaciones postraduccionales. Cuando el NO se suplementa de forma exógena, éste tiene un efecto protector frente a los daños oxidativos causados por el metal. Sin embargo, es necesario mejorar nuestros conocimientos sobre la función del NO en la respuesta temprana como molécula señalizadora y su relación con otras moléculas reguladoras como las hormonas vegetales y factores de transcripción. También es necesario profundizar en la función del NO en regulación de los procesos de translocación y acumulación del Cd en la célula vegetal, y por tanto, en la regulación de la actividad y expresión de transportadores de metales. Estos avances nos permitirían establecer programas de crecimiento de especies de interés agrícola con una menor capacidad de captación de metales y, por el contrario, otras especies con una mayor capacidad de captación de metales con fines de fitorremediación.

Referencias

- Albertos, P., Romero-Puertas, M.C., Tatematsu, K., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Nambara, E., Lorenzo, O. 2015. S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nature Communications* 6, 8669.
- Andersen, E., Peiter, E., Küpper, H. 2018. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany* 69, 909–954. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx465>
- Astier, J., Gross, I., Durner, J. 2018. Nitric oxide production in plants: An update. *Journal of Experimental Botany* 69(14), 3401–3411. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>
- Astier, J., Mounier, A., Santolini, J., Jeandroz, S., Wendehenne, D. 2019. The evolution of nitric oxide signalling diverges between animal and green lineages. *Journal of Experimental Botany* 70(17), 4355–4364. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz088>
- ATSDR 2012. *Toxicological profile for cadmium*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA, Estados Unidos. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tfp5.pdf>
- Barry, S.M., Kers, J.A., Johnson, E.G., Song, L., Aston, P.R., Patel, B., et al. 2012. Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis. *Nature Chemical Biology* 8(10), 814–6.
- Belleghem, F. Van, Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., Haen, J., et al. 2007. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 173: 495–508.
- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., et al. 2009. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology* 149(3), 1302–1315. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133348>
- Bethke, P.C., Jones, R.L. 2001. Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *The Plant Journal* 25, 19–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2001.00930.x>
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J. 2006. ABA induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal* 45, 113–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02615.x>
- Bruckdorfer, R. 2005. The basics about nitric oxide, *Molecular Aspects of Medicine* 26, 1–2, 3–31. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.002>
- Bücker-neto, L., Sobral-Paiva, A.L., Dorneles-Machado, R., Augusto-Arenhart, R., Margis-Pinheiro, M. 2017. Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genetics and Molecular Biology* 40(1), 373–386.
- Cánovas, D., Marcos, J.F., Marcos, A.T., Strauss, J. 2016. Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel? *Current Genetics* 62(3), 513–518. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0574-6>
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.F., Mari, S., Curie, C. 2009. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal* 422, 217–228.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.F., Mari, S., Curie, C. 2010. High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. *Plant Cell* 22, 904–917.
- Chamizo-ampudia, A., Sanz-luque, E., Llamas, A., Galvan, A., Fernandez, E. 2017. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science* 22(2), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>
- Clemens, S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88(11), 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900–905.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. 2014. Peroxisomal plant nitric oxide synthase (NOS) protein is imported by peroxisomal targeting signal type 2 (PTS2) in a process that depends on the cytosolic receptor PEX7 and calmodulin. *FEBS Letter* 588(12), 2049–2054. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.034>
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., Wendehenne, D. 2008. Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *Journal of Experimental Botany* 59:155–163.
- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le-Jean, M., et al. 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Annals of Botany* 103, 1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn207>
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., et al. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *BioMetals* 23(5), 927–940. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>
- Cuypers, A., Hendrix, S., dos-Reis, R.A., De-Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., et al. 2016. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science* 7(470). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00470>
- Dalcorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A. 2008. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(10), 1268–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x>
- De Abreu-Neto, J.B., Turchetto-Zolet, A.C., Valter-de-Oliveira, L.F., Bodanese-Zanettini, M. H., Margis-Pinheiro, M. 2013. Heavy metal-associated isoprenylated plant protein (HIPP): Characterization of a family of proteins exclusive to plants. *FEBS Journal* 280(7), 1604–1616. <https://doi.org/10.1111/febs.12159>
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585–588.
- De Michele, R., Vurro, E., Rigo, C., Costa, A., Elviri, L., Di Valentin, M., et al. 2009. Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiology* 150: 217–228. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133397>
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 10328–10333.
- Edelstein, M., Ben-Hur, M. 2018. Heavy metals and metalloids: sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae* 234(2), 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- European Environmental Agency 2019. *Heavy metal emissions*. [online]. Disponible en: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-heavy-metal-hm-emissions-1/assessment-10>
- European Food Safety Authority (EFSA) 2012. Cadmium dietary exposure in the European population. Scientific report of EFSA. *EFSA Journal* 10(1):2551.
- Fancy, N.N., Bahlmann, A.-K., Loake, G.J. 2017. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell and Environment* 40: 462–472. <https://doi.org/10.1111/pce.12707>
- Ferrer-Sueta, G., Campolo N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero N., Alvarez B., Radi R. 2018. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chemical Reviews* 118: 1338–1408.
- Ferrol, N., Tamayo, E., Vargas, P. 2016. The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications. *Journal of Experimental Botany* 67(22), 6253–6565. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw403>
- Fodor, F., Gáspár, L., Morales, F., Gogorcena, Y., Lucena, J.J., Cseh, E., et al. 2005. Effects of two iron sources on iron and cadmium allocation in poplar (*Populus alba*) plants exposed to cadmium. *Tree Physiology* 25, 1173–1180.
- Foyer, C.H. 2018. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental Experimental Botany* 154: 134–142.

- Fristachi, A., Choudhury, H. 2017. Cadmium. *International Encyclopedia of Public Health* 316–319. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803678-5.00043-6>
- Frungillo, L., Skelly, M.J., Loake, G.J., Spoel, S.H., Salgado, I. 2015. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications* 5, 5401. <https://doi.org/10.1038/ncomms6401>
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., et al. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>
- García-Gómez, C., Esteban, E., Sánchez-Pardo, B., Fernández, M.D. 2014. Assessing the ecotoxicological effects of long-term contaminated mine soils on plants and earthworms: Relevance of soil (total and available) and body concentrations. *Ecotoxicology* 23(7), 1195–1209. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1262-2>
- Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A., Ischiropoulos, H. 2004. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 287, 262–268.
- Gupta, N., Khan, D.K., Santra, S.C. 2010. Determination of public health hazard potential of wastewater reuse in crop production. *World Review of Science, Technology and Sustainable Development* 7(4), 328–340. <https://doi.org/10.1504/WRSTSD.2010.032741>
- Gupta, D.K., Pena, L.B., Romero-Puertas, M.C., Hernández, A., Inouhe, M., Sandalio, L.M. 2017. NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. *Plant Cell and Environment* 40(4), 509–526. <https://doi.org/10.1111/pce.12711>
- Gutsch, A., Keunen, E., Guerriero, G., Renaut, J., Cuypers, A., Hausman, J.F., et al. 2018. Long-term cadmium exposure influences the abundance of proteins that impact the cell wall structure in *Medicago sativa* stems. *Plant Biology* 20(6), 1023–1035. <https://doi.org/10.1111/plb.12865>
- Gzyl, J., Izbińska, K., Floryszak-Wieczorek, J., Jelonek, T., Arasimowicz-Jelonek, K.M. 2016. Cadmium affects peroxynitrite generation and tyrosine nitration in seedling roots of soy bean (*Glycine max* L.). *Environmental and Experimental Botany* 131, 155–163.
- Hancock, J.T., Neill, S.J. 2019. Nitric Oxide: Its Generation and Interactions with Other Reactive Signaling Compounds. *Plants* 41: 1–14.
- Hayes, W.M. 2016. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 97th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, Estados Unidos.
- He, Z., Shentu, J., Yang, X., Baligar, V.C., Zhang, T., Stoffella, P.J. 2015. Heavy metal contamination of soils: sources, indicators, and assessment. *Journal of Environmental Indicators* 9, 17–18.
- Hess, D.T., Stamler, J.S. 2012. Regulation by S-Nitrosylation of Protein Post-translational. *Journal of Biological Chemistry* 287(7), 4411–4418. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.285742>
- Heyno, E., Klose, C., Krieger-Liszkay, A. 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: Mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytology* 179, 687–699. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02512.x>
- Hu, Y., Lu, L., Tian, S., Li, S., Liu, X., Gao, X., et al. 2019. Cadmium-induced nitric oxide burst enhances Cd tolerance at early stage in roots of a hyperaccumulator *Sedum alfredii* partially by altering glutathione metabolism. *The Science of the Total Environment* 650, 2761–2770. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.269>
- Huybrechts, M., Cuypers, A., Deckers, J., Iven, V., Vandionant, S., Jozefczak, M., et al. 2019. Cadmium and plant development: an agony from seed to seed. *International Journal of Molecular Sciences* 20(3971), 1–30.
- Ismael, M., Elyamine, A., Moussa, M.G., Cai, M., Zhao, X., Hu, C. 2019. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. *Metallomics* 11(2), 255–277. <https://doi.org/10.1039/c8mt00247a>
- Jaffrey S.R., Snyder S.H. 2001. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE* 2001(86):pl1. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.86.pl1>
- Jozefczak, M., Bohler, S., Schat, H., Horemans, N., Guisez, Y., Remans, T., et al. 2015. Both the concentration and redox state of glutathione and ascorbate influence the sensitivity of Arabidopsis to cadmium. *Annals of Botany* 116(4), 601–612. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv075>
- Kaur, H., Whiteman, M., Halliwell, B. 1997. Peroxynitrite-dependent aromatic hydroxylation and nitration of salicylate and phenylalanine. Is hydroxyl radical involved? *Free Radical Research* 26(1), 71–82.
- Kong, Z., Glick, B.R. 2017. The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. *Advances in Microbial Physiology* 71, 97–132. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.04.001>
- Korenkov, V., Hirschi, K., Crutch, J.D., George, W.J. 2007. Enhancing tonoplast Cd / H antiport activity increases Cd , Zn , and Mn tolerance , and impacts root / shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L . *Planta* 226, 1379–1387. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0577-0>
- Kumari, A., Pathak, P.K., Bulle, M., Igamberdiev, A.U., Gupta, K.J. 2019. Alternative oxidase is an important player in the regulation of nitric oxide levels under normoxic and hypoxic conditions in plants. *Journal of Experimental Botany* 70: 4345–4354.
- León, J., Costa-Broseta, Á. 2019. Present knowledge and controversies, deficiencies and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing and signaling in plants. *Plant, Cell and Environment* (7), 1–15. <https://doi.org/10.1111/pce.13617>
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583–593
- Li, C., Zhou, K., Qin, W., Tian, C., Qi, M., Yan, X., Han, W. 2019. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. *Soil and Sediment Contamination* 28(4), 380–394. <https://doi.org/10.1080/15320383.2019.1592108>
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J.S. 2001. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410(6827), 490–494. <https://doi.org/10.1038/35068596>
- Liu, S., Yang, R., Tripathi, D. K., Li, X., He, W., Wu, M., et al. 2018. The interplay between reactive oxygen and nitrogen species contributes in the regulatory mechanism of the nitro-oxidative stress induced by cadmium in Arabidopsis. *Journal of Hazardous Materials* 344, 1007–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.12.004>
- Lombardo, M.C., Graziano, M., Polacco, J.C., Lamattina, L. 2006. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling and Behaviour* 1, 28–33
- Martínez-Medina, A., Pescador, L., Terrón-Camero, L.C., Pozo, M.J., Romero-Puertas, M.C. 2019. Nitric oxide in plant–fungal interactions. *Journal of Experimental Botany* 70: 4489–4503
- Mason, R.P. 2013. *Trace Metals in Aquatic Systems*. 1st ed. Wiley-Blackwell. Hoboken, NJ, Estados Unidos.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology* 14(3), 277–282. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(03\)00060-0](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(03)00060-0)
- Meychik, N.R., Yermakov, I.P. 2001. Ion exchange properties of plant root cell walls. *Plant and Soil* 234(2), 181–193. <https://doi.org/10.1023/A:1017936318435>
- Mezyska, M., Brzóska, M.M. 2018. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies. *Environmental Science and Pollution Research* 25(4), 3211–3232. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0827-z>
- Mishina, T.E., Lamb, C., Zeier, J. 2007. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 30, 39–52
- Mohn, M.A., Thaqi, B., Fischer-Schrader, K. 2019. Isoform-Specific NO Synthesis by Arabidopsis *thaliana* Nitrate Reductase. *Plants* 8, 67, 1–15.
- Møller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58, 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- Mur, L.A.J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., et al. 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB PLANTS* 5, 1–17. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters* 8(3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129(1), 185–195. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x>
- Ortega-Galisteo, A.P., Rodríguez-Serrano, M., Paz-miño, D.M., Gupta, D.K., Sandalio, L.M., Romero-Puertas, M.C. 2012. S-nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 63, 2089–2103.

- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lamattina L. 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132, 1241–1248.
- Pastori, G.M., del Rio, L.A. 1997. Natural senescence of pea leaves (an activated oxygen-mediated function for peroxisomes). *Plant Physiology* 113 (2), 411–418. <https://doi.org/10.1104/pp.113.2.411>
- Pérez-Chaca, M.V., Rodríguez-Serrano, M., Molina, A.S., Pedranzani, H.E., Zirulnik, F., Sandalio, L.M., Romero-Puertas, M.C. 2014. Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in Glycine max (L.) roots. *Plant, Cell and Environment* 1672–1687. <https://doi.org/10.1111/pce.12280>
- Petrov, V.D., Van Breusegem, F. 2012. Hydrogen peroxide — a central hub for information flow in plant cells. *AoB PLANTS* pls014, 1–13. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls014>
- Pilon-smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56(1), 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
- Rahman, Z., Singh, V.P. 2019. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment* 191(7), 419 1-21. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7528-7>
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180(2), 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Reeves, R.D. 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants, En: Morel, J.L., Echevarria, G., Goncharova, N. (eds.), *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, pp. 1–25. NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Springer, NY, Estados Unidos.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Pazmino, D. M., Testillano, P. S., Risueno, M. C., del Rio, L.A., Sandalio, L.M. 2009. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* 150(1), 229–243. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131524>
- Romero-Puertas, M.C., Terrón-Camero, L.C., Peláez-Vico, M.Á., Olmedilla, A., Sandalio, L.M. 2019. Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. *Environmental and Experimental Botany* 161(August 2018), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.012>
- Sabolić, I., Breljak, D., Škarica, M., Herak-Kramberger, C.M. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *BioMetals* 23(5), 897–926. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9351-z>
- Sánchez-Vicente, I., Fernández-Espinosa, M.G., Lorenzo, O. 2019. Nitric oxide molecular targets: reprogramming plant development upon stress. *Journal of Experimental Botany* 70, 4441–4460. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz339>
- Sanz-Fernández, M., Rodríguez-Serrano, M., Sevilla-Perea, A., Pena, L., Mingorance, M.D., Sandalio, L.M., et al. 2017. Screening Arabidopsis mutants in genes useful for phytoremediation. *Journal of Hazardous Materials* 335, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.021>
- Satarug, S., Garrett, S.H., Sens, M.A., Sens, D.A. 2010. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environmental Health Perspectives* 118(2), 182–190. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901234>
- Satarug, S., Vesey, D.A., Gobe, G.C. 2017. Health risk assessment of dietary cadmium intake: Do current guidelines indicate how much is safe? *Environmental Health Perspectives* 125(3), 284–288. <https://doi.org/10.1289/EHP108>
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M. 2002. The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany* 53(379), 2381–2392. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf107>
- Seligman, K., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Pinto-Maglio, C.A.F., Salgado, I. 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in Arabidopsis thaliana is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and Cell Physiology* 49, 1112–1121.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Misalski, Z. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica* 54(1), 39–50. https://doi.org/10.18388/abp.2007_3267
- Sturms, R., DiSpirito, A.A., Fulton, D.B., Hargrove, M.S. 2011. Hydroxylamine reduction to ammonium by plant and cyanobacterial hemoglobins. *Biochemistry* 50(50), 10829–10835. <https://doi.org/10.1021/bi201425f>
- Sun, R.L., Zhou, Q.X., Jin, C.X. 2006. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant Soil* 285(1–2), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-0064-6>
- Terrón-Camero, L.C., Peláez-Vico, M.Á., Del Val, C., Sandalio, L.M., Romero-Puertas, M.C. 2019. Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: exogenous application versus endogenous production. *Journal of Experimental Botany* 70 (17), 4477–4488. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz184>
- Terrón-Camero, L., del Val, C., Sandalio, L.M., Romero-Puertas, M.C. 2020. Low endogenous NO levels in roots and antioxidant systems are determinants for the resistance of Arabidopsis seedlings grown in Cd. *Environmental Pollution* 256: 113411.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 4991–4996.
- UNEP 2010. Final review of scientific information on cadmium. *UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland*, pp.324. http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/27636/Cadmium_Review.pdf
- Van De Mortel, J.E., Schat, H., Moerland, P.D., Van Themaat, E.V.L., Van Der Ent, S., Blankestijn, H., et al. 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in Arabidopsis thaliana and the related Zn/Cd-hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment* 31(3), 301–324. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01764.x>
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, L., Briat, J., et al. 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell* 14(6), 1223–1233. <https://doi.org/10.1105/tpc.001388>
- Vral, A., Fenech, M., Thierens, H. 2011. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis* 26(1), 11–17. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq078>
- Wang, D., Sun, H., Wu, Y., Zhou, Z., Ding, Z., Chen, X., Xu, Y. 2016. Tubular and glomerular kidney effects in the Chinese general population with low environmental cadmium exposure. *Chemosphere* 147, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.069>
- Wu, E.W., Schaumberg, D.A., Park, S.K. 2014. Environmental cadmium and lead exposures and age-related macular degeneration in U.S. adults: the national health and nutrition examination survey 2005 to 2008. *Environmental Research* 133, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.05.023>
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network* 2011, 1-20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- Xiong, J., An, L., Lu, H., Zhu, C. 2009. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. *Planta* 230, 755–765. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0984-5>
- Xu, S., Guerra, D., Lee, U., Vierling, E. 2013. S-nitrosoglutathione reductases are low-copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 4(11), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00430>
- Zhang, H., Reynolds, M. 2019. Cadmium exposure in living organisms: a short review. *Science of the Total Environment* 678, 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395>
- Zhan, N., Wang, C., Chen, L., Yang, H., Feng, J., Gong, X., et al. 2018. S-Nitrosylation targets GSNO reductase for selective autophagy during hypoxia responses in plants. *Molecular Cell* 71(1), 142–154.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.024>
- Zhang, Y., Hu, J., Bai, J., Wang, J., Yin, R., Wang, J., et al. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate the heavy metal toxicity on sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants cultivated on a heavily contaminated field soil at a WEEE-recycling site. *Science of the Total Environment* 628, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.331>
- Zhao, H., Jin, Q., Wang, Y., Chu, L., Li, X., Xu, Y. 2016. Effects of nitric oxide on alleviating cadmium stress in *Typha angustifolia*. *Plant Growth Regulation* 78(2), 243–251. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0089-z>
- Zhao, Y.L., Stephen, L., Garrison, C., Gonzalez, W., Thweatt, D., Marquez, M. 2007. N-nitrosation of amines by NO₂ and NO: A theoretical study. *Journal of Physical Chemistry A* 111, 11, 2200–2205.