



Universitat Autònoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**Morbilidad, inflamación de bajo grado y riesgo cardiovascular
en pacientes que han sufrido síndrome de Cushing:
Estudio observacional de casos y controles**

María José Barahona Constanzo

Directora de tesis: Susan Webb Youdale

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

Universitat Autònoma de Barcelona

2010



Universitat Autònoma de Barcelona

TESIS DOCTORAL

**Morbilidad, inflamación de bajo grado y riesgo cardiovascular
en pacientes que han sufrido síndrome de Cushing:
Estudio observacional de casos y controles**

María José Barahona Constanzo

Directora de tesis: Susan Webb Youdale

Departamento de Medicina, IIB-Hospital Sant Pau, Servicio de Endocrinología y Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBER-ER Unidad 747).

Universitat Autònoma de Barcelona, 2010.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que han contribuido de alguna manera a la realización de esta tesis, en especial a las siguientes:

A la Dra Susan Webb, mi tutora, que me ha introducido en el mundo de la investigación clínica. Su inagotable energía y vitalidad han sido fundamentales para que, tras 7 años y no pocas dificultades, haya podido finalizar este proyecto.

A todos los coautores de los trabajos que forman parte de esta tesis, en especial al Dr Fernández-Real y Dr Wifredo Ricart por sus brillantes aportaciones. A Nuria Sucunza, el apoyo mutuo en las fases iniciales del trabajo fue fundamental.

A mis padres, a los que este trabajo está dedicado, porque gracias a ellos he conseguido llegar hasta aquí, y me han transmitido valores como el esfuerzo y la perseverancia. A mi hermano, por estar siempre cuando lo necesito. Y en especial a Norbert, por su apoyo incondicional y paciencia infinita.

A mis compañeros de trabajo de los últimos 4 años en el Hospital Mútua de Terrassa, y en especial al Dr Jordi Anglada, por su humanidad, comprensión y apoyo.

Y por supuesto, a todos los pacientes con síndrome de Cushing y controles sanos que dieron su consentimiento para participar en este estudio. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible.

Estos trabajos han sido financiados por una beca del Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria 05/0448) y de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT 2003 FI00102).

SUMARIO

Agradecimientos	5
Lista de artículos.....	9
Lista de abreviaturas.....	11
Introducción.....	13
- Definición, prevalencia y etiología del síndrome de Cushing.....	15
- Cuadro clínico y su relación con el síndrome metabólico.....	15
- Síndrome de Cushing y mortalidad cardiovascular.....	16
- Persistencia de morbilidad tras la curación del síndrome de Cushing.....	17
Hipótesis	21
Objetivos.....	23
Material y métodos.....	25
- Pacientes.....	27
▪ Población control.....	29
▪ Criterios de exclusión.....	29
- Métodos.....	30
▪ Diseño.....	30
▪ Estudio antropométrico.....	30
▪ Composición corporal.....	30
▪ Definición de síndrome metabólico.....	30
▪ Parámetros de laboratorio.....	31
▪ Análisis estadístico.....	33

Resultados.....	35
- Efectos del hipercortisolismo en el metabolismo.....	37
- Efectos del hipercortisolismo en la composición corporal e inflamación.....	37
▪ Masa grasa y masa magra.....	37
▪ Hueso.....	39
Discusión.....	43
- Persistencia de alteraciones metabólicas.....	45
- Persistencia de una composición corporal anómala.....	45
▪ Diferencias según el nivel estrogénico en la composición corporal....	49
▪ Efecto del hipercortisolismo endógeno y exógeno en la composición corporal.....	49
- Persistencia de un patrón anómalo en la secreción de adipocinas.....	52
Conclusiones finales.....	55
Bibliografía.....	57
Publicaciones.....	69
Anexos:	
- Anexo I: Gráficos y tablas.....	85
- Anexo II: Diagnóstico de curación en el síndrome de Cushing: lecciones del seguimiento a largo plazo	93

LISTA DE ARTÍCULOS

La parte fundamental de la tesis está basada en los siguientes dos artículos, los cuales se nombran en el texto por sus respectivos números romanos:

ARTÍCULO I:

Barahona MJ, Sucunza N, Resmini E, Fernández-Real JM, Ricart W, Moreno-Navarrete JM, Puig T, Farrerons J, Webb SM 2009 Persistent body fat mass and inflammatory marker increases after long-term cure of Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 94: 3365-3371.

ARTÍCULO II:

Barahona MJ, Sucunza N, Resmini E, Fernández-Real JM, Ricart W, Moreno-Navarrete JM, Puig T, Wägner AM, Rodríguez-Espinosa J, Farrerons J, Webb SM 2009 Deleterious effects of glucocorticoid replacement on bone in women after long-term remission of Cushing's syndrome. J Bone Miner Res 24: 1841-1846.

Según la resolución de la Subcomisión de Postgrado la siguiente publicación no puede formar parte del cuerpo fundamental de la tesis por no estar prevista todavía la fecha de publicación, por lo que aparece en el **ANEXO II**; pero tal y como permite la normativa, los datos de dicho artículo se comentan en la discusión:

Barahona MJ, Resmini E, Sucunza N, Webb SM. Diagnosis of cure in Cushing's syndrome: lessons from long-term follow-up. Front Horm Res (in press).

ABREVIATURAS

SC	Síndrome de Cushing
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
GC	Glucocorticoides
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
IL-6	Interleuquina-6
PCR	Proteína C reactiva ultrasensible
sTNF-R1	Receptor 1 soluble del factor de necrosis tumoral α
sTNF-R2	Receptor 2 soluble del factor de necrosis tumoral α
IMC	Índice de masa corporal
DEXA	Dual-Energy X-Ray Absorptiometry
GH	Hormona de crecimiento
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
TSH	Hormona estimulante de la tiroides (tirotropina)
FT4	Tiroxina libre
NCEP	National Cholesterol Education Program
ATP-III	Adult Treatment Panel III
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Total P1NP	Total amino-terminal propeptide of type 1 procollagen
β -Crosslaps	Carboxy-terminal telopeptide
HOMA	Homeostasis Model Assessment
CV	Coefficiente de variación
CMO	Contenido mineral óseo

DMO	Densidad mineral ósea
PA	Presión arterial
AMP	Adenosín monofosfato
11 β -HSD1	11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 1

INTRODUCCIÓN

Definición, prevalencia y etiología del síndrome de Cushing

El síndrome de Cushing (SC) comprende el conjunto de signos y síntomas ocasionados por un incremento en las concentraciones sanguíneas de cortisol.

El SC endógeno es una entidad muy rara, no así el SC iatrogénico o exógeno, que es la causa más frecuente de SC, teniendo en cuenta la prescripción frecuente de glucocorticoides. La prevalencia de la enfermedad de Cushing (que es la causa más frecuente de SC endógeno) en España se calcula en 39,1 casos por millón de habitantes, mientras que la incidencia de nuevos casos es de 2,4 casos por millón de habitantes y año (1), lo que supondría unos 100 casos nuevos cada año en todo el país. Dada su baja incidencia, existen pocos estudios con número suficiente de casos como para ser informativos, lo que hace recomendable la revisión de la casuística de los centros con más experiencia. El SC es más frecuente en mujeres que en hombres, con un ratio de 3-5:1 (2).

En la mayoría de los casos el SC es dependiente de corticotropina (ACTH-dependiente; comprende el 80% de los casos), debido a un exceso de producción de ACTH por un tumor hipofisario (enfermedad de Cushing, 70%) o por un tumor de origen ectópico (10%). Menos frecuentemente, el SC es ACTH-independiente (20% de los casos), como resultado de un exceso de producción de cortisol por un adenoma suprarrenal (10%) o carcinoma (8%), y menos frecuentemente por una hiperplasia bilateral (2%).

Cuadro clínico y su relación con el síndrome metabólico

Los pacientes sufren, entre otras manifestaciones, obesidad de distribución central, hipertensión arterial, dislipemia e intolerancia a la glucosa o diabetes, además de aumento de factores pro-coagulantes, todos ellos componentes del llamado síndrome

metabólico, que se asocia a un elevado riesgo cardiovascular (3,4). Ninguno de estos síntomas es suficientemente específico del SC, son síntomas muy prevalentes en la población general, cosa que dificulta el diagnóstico de la enfermedad. De hecho, el síndrome metabólico constituye una de las grandes epidemias del siglo XXI. Su relación con las enfermedades cardiovasculares hacen de su estudio una prioridad sanitaria. Una de las hipótesis que intentan explicar el desarrollo del síndrome metabólico es la alteración en la regulación hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (5). Una mala adaptación a las situaciones de estrés, con una inadecuada supresión de la síntesis de ACTH mediada por el cortisol, favorecería una acción corticoidea excesiva y podría dar lugar a las manifestaciones asociadas (6,7). El extremo máximo de la alteración en la retroalimentación negativa en el eje corticotropo está representado por los tumores productores de ACTH o cortisol, que dan lugar al síndrome de Cushing.

Síndrome de Cushing y mortalidad cardiovascular

Los estudios más antiguos muestran una mortalidad superior al 50% a los 5 años en los pacientes con SC, con una alta prevalencia de enfermedad aterosclerótica, a pesar de tratarse de sujetos jóvenes (8). En los años 80, la supervivencia después de la adrenalectomía estaba en torno al 79% a los 5 años y al 72% a los 10 años, con un 55% de muertes de causa cardiovascular (9). Desde entonces, las medidas terapéuticas de que se dispone han mejorado sustancialmente y consecuentemente también ha mejorado el pronóstico de los pacientes (10-12). Se ha descrito una mortalidad 4 veces superior a la de la población general, principalmente de causa cardiovascular (1), aunque hay otros estudios que no encuentran un aumento de dicha mortalidad (13,14).

Persistencia de morbilidad tras la curación del SC

Un estudio reciente realizado en pacientes con SC muestra que, a pesar de la curación del hipercorticismismo, puede persistir un aumento del riesgo cardiovascular y ateromatosis carotídea hasta 5 años después de la curación (15). Sabemos que en pacientes con SC en fase activa, así como en situaciones que requieren un tratamiento prolongado con GC exógenos, se produce una alteración de la composición corporal, principalmente aumento de la masa grasa de distribución central, y disminución de la masa magra y ósea (16-20). Sin embargo, poco se conoce sobre la composición corporal en pacientes con SC tras curación a largo plazo. Se asume que tras la resolución del hipercorticismismo se produce una normalización de la composición corporal; se ha descrito una disminución de la masa grasa en la fase inicial de recuperación tras cirugía curativa en pacientes con SC (21,22). Sin embargo, pacientes que han sufrido un SC, ya sea endógeno o exógeno, a menudo se quejan de persistencia de obesidad, principalmente de distribución central, a pesar de estar curados, o en el caso del SC exógeno, a pesar de haber abandonado el tratamiento corticoideo.

Algunos estudios muestran una recuperación completa de la masa ósea tras la curación del SC (23-25); sin embargo, otros muestran una recuperación incompleta (26-28), y no está claro el tiempo necesario para conseguir la recuperación total de la masa ósea. En los últimos años se ha despertado un gran interés sobre el efecto de la sustitución prolongada con glucocorticoides sobre el hueso en enfermedades endocrinológicas, como el déficit de 21-hidroxilasa o la insuficiencia suprarrenal primaria (29-31). La optimización de la terapia de sustitución con GC resulta difícil, ya que la administración oral de los fármacos que disponemos en la actualidad a menudo no simula el ritmo circadiano endógeno, además el tratamiento oral resulta difícil de monitorizar (32,33). Los pacientes con SC, sobre todo cuando el tratamiento ha sido un

éxito, a menudo presentan una fase de insuficiencia suprarrenal, requiriendo sustitución con glucocorticoides durante un periodo variable de tiempo, que en ocasiones se ha de mantener de por vida. Se desconoce si esta exposición a glucocorticoides exógenos, aparte del efecto del hipercortisolismo endógeno, tiene algún efecto sobre la masa ósea en aquellos pacientes con SC curado.

La concepción del tejido adiposo ha cambiado con el tiempo; así como anteriormente se le consideraba un almacén de la energía sobrante, actualmente sabemos que el tejido adiposo es un importante órgano endocrino. Los factores secretados por el tejido adiposo son las adipoquinas, que intervienen en la regulación de la acción de la insulina, en la homeostasis energética, en la inflamación y otros procesos fisiológicos. Se han descrito cambios en la secreción de adipoquinas en situaciones como la obesidad o diabetes tipo 2, con un aumento de los niveles de TNF α , IL-6 y PCR, entre otros, y una reducción de los niveles de adiponectina (34). Sin embargo, no existen datos sobre los niveles de adipoquinas en pacientes con SC tras curación a largo plazo. Las adipoquinas, que ya hemos mencionado que tienen efectos sobre la inflamación, la aterosclerosis y la resistencia a la insulina, podrían ser el nexo de unión entre la grasa y la enfermedad cardiovascular (35). Los niveles plasmáticos de IL-6, sTNF-R1 y sTNF-R2 se correlacionan de forma positiva, y la adiponectina se correlaciona de forma negativa con la grasa corporal y la resistencia a la insulina (36,37). Estas adipoquinas se relacionan de forma significativa con un incremento del riesgo de enfermedad coronaria (38-41).

Por tanto, aunque existen datos que apuntan hacia una mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular (42), como los que se encuentran en el síndrome metabólico, y un incremento en la mortalidad de los pacientes con síndrome de Cushing (1), los estudios

realizados hasta ahora presentan algunos inconvenientes fundamentales: A) La mayoría no incluyen pacientes con hipercorticismo de origen extrahipofisario; B) El grupo control no ha sido obtenido de la población general, sino que, mayoritariamente se seleccionan sujetos sin hipertensión ni enfermedad cardiovascular previas, lo que podría magnificar falsamente las diferencias entre los grupos; y C) No existen estudios recientes que valoren el riesgo cardiovascular de estos pacientes pasados los 5 años de su curación.

HIPÓTESIS

Los pacientes con SC en fase activa manifiestan componentes del síndrome metabólico, exhibiendo mayor riesgo y morbi-mortalidad cardiovascular que la población general. Se ha demostrado que el aumento del riesgo cardiovascular puede persistir hasta 5 años después de la curación del SC. Esta persistencia del riesgo cardiovascular, a pesar de la curación, puede estar mediada por la persistencia de una composición corporal anómala, principalmente por un aumento de la grasa de distribución central, que ocasionaría una mayor secreción de moléculas inflamatorias (como IL-6 y TNF α) y una reducción de moléculas con propiedades antiinflamatorias, como la adiponectina. Este perfil desfavorable ocasionaría daño vascular y por tanto, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular.

OBJETIVOS

- 1- Evaluar la composición corporal (masa magra, masa grasa total y troncular, y masa y densidad mineral óseas) en pacientes con SC tras curación a largo plazo y compararla con pacientes con SC en fase activa y con controles sanos apareados por edad, sexo e IMC.

- 2- Determinar los niveles de adipoquinas con actividad inflamatoria y otras con actividad antiinflamatoria en pacientes con SC tras curación a largo plazo y compararlos con pacientes en fase activa y con controles sanos.

- 3- Determinar la presencia de factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes, insulinoresistencia, dislipemia) en pacientes con SC tras curación a largo plazo y compararlos con pacientes en fase activa y en controles sanos. Analizar el porcentaje de pacientes que cumplen criterios de síndrome metabólico en los 3 grupos de pacientes, y también analizar cada criterio de forma individual.

- 4- Evaluar el efecto del hipercortisolismo endógeno y del tratamiento sustitutivo con glucocorticoides sobre la composición corporal en pacientes con SC curado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron como pacientes todos aquellos con diagnóstico de SC endógeno, bien por adenoma hipofisario (enfermedad de Cushing) o adenoma(s) suprarrenal(es), sin límite de edad, controlados en el Hospital de Sant Pau desde 1982. Se excluyeron aquellos pacientes con carcinomas adrenales o tumoraciones de origen ectópico dado su peor pronóstico. Se identificaron un total de 96 pacientes con SC, de los cuales 5 habían fallecido y 30 se perdieron durante el seguimiento (incluyendo aquellos pacientes procedentes de otras regiones de España operados en nuestro hospital y que tras conseguir la remisión del hipercortisolismo continuaron con el seguimiento por sus anteriores médicos). De los pacientes restantes, 10 eran hombres y 51 mujeres. De los hombres, la edad media era de 45 años, 7 estaban en remisión y 3 en fase activa de la enfermedad. De las mujeres, la edad media era de 48 años, 37 en remisión y 14 en fase activa.

En los **artículos I y II** se incluyeron únicamente a las mujeres con SC (37 en remisión y 14 en fase activa), excluyéndose del estudio a los hombres dada la escasez y heterogeneidad de la muestra. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado después de la aprobación del estudio por el comité ético del hospital. De las 14 mujeres con SC en fase activa, la edad media era de 46 ± 12 años, 4 de ellas tenían una recidiva de la enfermedad, 13 eran de origen hipofisario y 1 de origen adrenal. De las 37 mujeres en remisión, la edad media en el momento del estudio era de 50 ± 14 años, mientras que la edad en el momento del diagnóstico del SC era de 36 ± 12 años. La duración media de la curación hormonal que comprende desde la normalización del cortisol hasta la fecha del estudio fue de 11 ± 6 años (rango: 0.7-22 años). Únicamente 1 paciente desarrolló los síntomas a la edad de 9 años, mientras que el resto los iniciaron a

la edad adulta. En las pacientes con tumoración suprarrenal se les realizó una suprarrenalectomía unilateral, excepto en 1 que requirió suprarrenalectomía bilateral. A 26 pacientes con tumoración hipofisaria se les practicó cirugía por abordaje transesfenoidal y a 1 una suprarrenalectomía bilateral inicial. Siete pacientes requirieron una segunda cirugía (6 abordaje transesfenoidal y 1 suprarrenalectomía bilateral) y 2 una tercera cirugía (suprarrenalectomía bilateral). Diez pacientes recibieron radioterapia. Dieciséis mujeres eran postmenopáusicas y 21 premenopáusicas. La duración media del hipercortisolismo endógeno fue de 70 meses (rango: 13-241 meses). Se consideró la duración del hipercortisolismo endógeno como el periodo comprendido entre el inicio de los síntomas (tal y como referían los pacientes) y el diagnóstico del SC más el periodo de tiempo entre el diagnóstico y la remisión del hipercortisolismo después del tratamiento. En el **artículo II** también se incluye la duración media del tratamiento con GC que fue de 42 meses (rango: 2-420 meses). La hidrocortisona oral fue el fármaco utilizado de 2 a 3 veces diarias como terapia sustitutiva en todos los casos que así lo requirieron. La dosis media de GC fue de 20 mg/día. La duración del tratamiento con GC se definió como el periodo de tiempo en meses que los pacientes requirieron terapia sustitutiva con GC; en aquéllos todavía en tratamiento con GC, la duración se calculó desde el inicio de la terapia sustitutiva hasta la fecha en que se realizó la DEXA. La dosis de GC diaria se expresó como dosis por superficie corporal por día (mg/m²/d). El área de superficie corporal se calculó a través de la fórmula de Mosteller (43). La dosis media de GC fue de 11±4 mg/m²/d.

Un paciente con SC se consideraba en remisión si se demostraba una insuficiencia suprarrenal (cortisol basal a.m. < 100 nmol [$< 4\mu\text{g}/\text{dl}$] y/o cortisol libre en orina de 24 horas indetectable) o una supresión del cortisol matutino (<50 nmol/l, <1.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$) tras 1 mg de dexametasona nocturna.

Se recogió información sobre la función hipofisaria (GH, IGF-1, TSH, T4 libre, prolactina y gonadotrofinas), tal y como se había descrito previamente (44).

De los pacientes curados, 10 (27%) tenían insuficiencia suprarrenal en el momento de la evaluación con DEXA y requirieron tratamiento sustitutivo con GC, mientras los 27 restantes presentaron una insuficiencia suprarrenal transitoria y en el momento del estudio ya no precisaban tratamiento con GC. En el momento de la realización de la DEXA, 7 pacientes (19%) presentaban déficit de GH (2 de los cuales recibían tratamiento sustitutivo con GH humana recombinante), 7 (19%) presentaban déficit de gonadotrofinas (4 de ellas estaban en tratamiento hormonal sustitutivo con estrógenos/progestágenos, sólo 1 de ellas era postmenopáusia), y 5 (13.5%) eran hipotiroideas (todas en tratamiento con levotiroxina).

Población control

Se seleccionaron varios controles no afectados de SC, para cada caso seleccionado, a partir del censo de donantes de sangre de nuestro hospital, que donaron en la misma fecha en que se diagnosticó la enfermedad endocrina, apareados por edad y sexo. Para evitar conflictos con la ley de protección de datos, asimismo se requirió que el donante tuviera historia clínica en el hospital. Se enviaron cartas a los controles seleccionados, realizándose una llamada telefónica 1 semana después, se incluyeron en el estudio el primero o los 2 primeros controles en aceptar. En los **artículos I y II** se incluyeron a 85 controles, apareados por edad y sexo con los pacientes del estudio.

Criterios de exclusión

Tanto en pacientes como en controles se excluyeron aquellos sujetos con infección de vías respiratorias o cualquier otro proceso infeccioso/inflamatorio agudo en el último

mes, así como pacientes con procesos inflamatorios crónicos en actividad (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, etc.).

Métodos

Diseño:

Los artículos I y II son estudios observacionales de casos y controles.

Estudio antropométrico:

Se recogió el peso, la talla, y el perímetro de cintura y cadera. El índice de masa corporal se calculó como el peso en Kg dividido por la talla en m². Para medir el perímetro de la cintura se fijó un punto a mitad de camino entre la última costilla y la cresta ilíaca, en ese punto se colocó la cinta métrica alrededor de la cintura y se midió el perímetro, con el paciente en espiración. Todos los datos derivados de la exploración física tanto en pacientes como en controles fueron recogidos por el mismo investigador (M.J.B).

Composición corporal:

Para determinar la composición corporal se utilizó la absorciometría dual de rayos X, disponible en el Hospital de Sant Pau (DEXA, Delphi QDR 4500, Hologic, Vilvoorde, Belgium). El coeficiente de variación es del 1%. Se calculó la masa grasa total y troncular, la masa magra, la masa ósea y la densidad mineral ósea lumbar y total.

Definición del síndrome metabólico:

Como definición se utilizaron los criterios del National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III) (45), modificados por la American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (46). Estos criterios son:

1) obesidad abdominal, considerada como un perímetro de cintura > 102 cm (hombres) o 88 cm (mujeres); 2) concentración de glucosa plasmática en ayunas \geq 100 mg/dL (5.6 mmol/L), diagnóstico de diabetes o la utilización de medicación hipoglucemiante; 3) concentración de triglicéridos en plasma \geq 150 mg/dL (1.7 mmol/L) y/o la utilización de tratamiento farmacológico; 4) concentración de HDL < 40 mg/dL (1.03 mmol/L) en hombres o < 50 mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres; y 5) tensión arterial sistólica \geq 130 mmHg y tensión arterial diastólica \geq 85 mmHg, o la utilización de medicación antihipertensiva.

Parámetros de laboratorio:

Se determinaron los siguientes parámetros séricos: colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, colesterol-LDL, lipoproteína A, apolipoproteína B, glucosa, insulina, fibrinógeno y creatinina. Como marcadores de inflamación se determinaron en plasma los niveles de: interleuquina-6 (IL-6), proteína C reactiva ultrasensible (PCR), el receptor 1 soluble del TNF α (sTNF-R1) y el receptor 2 soluble del TNF α (sTNF-R2). También se determinaron los niveles de las adipocitoquinas: adiponectina y visfatina. Como marcadores óseos se determinaron: osteocalcina y total amino-terminal propeptide of type 1 procollagen (total P1NP) como marcadores de formación ósea; y el carboxy-terminal telopeptide (β -Crosslaps) como marcador de resorción ósea.

Las extracciones se realizaron en ayunas. Las variables de rutina, así como los marcadores óseos, se realizaron con técnicas habituales en el Laboratorio de Bioquímica, Hematología y Coagulación del Hospital de Sant Pau. Se determinaron estas variables diariamente con la inclusión de cada sujeto: colesterol total y

triglicéridos por métodos enzimáticos, HDL-colesterol por método directo, sin precipitación; LDL-colesterol por la fórmula de Friedewald;

la lipoproteína A, homocisteína y apolipoproteína B por inmunoturbidimetría, estandarizado frente al estándar WHO/IFCC SP3-07 y tamaño predominante de las partículas de LDL por electroforesis en gel de poliacrilamida. La insulinemia se determinó mediante radioinmunoanálisis (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). La resistencia a la insulina se calculó utilizando la fórmula del Homeostasis Model Assessment (HOMA)= (insulin μ U/mL x glucose mmol/L)/22.5. El fibrinógeno se calculó mediante el método coagulativo de von Clauss. Las variables especiales del proyecto se analizaron en grupos de muestras para disminuir la variabilidad, en el laboratorio de investigación del Hospital de Girona (las muestras se recogieron y almacenaron a -80°C hasta su uso). La adiponectina se determinó mediante ELISA (ref: EZHADP-61K, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) con un CV intra-ensayo de 3.4%, y un CV inter-ensayo de 5.7%. Las concentraciones séricas de visfatina se determinaron mediante enzima inmunoensayo (Phoenix Peptides, Karlsruhe, Germany) con un CV intra-ensayo de <5%, y un CV inter-ensayo de <14%. La PCR ultrasensible se determinó por ELISA; sus valores de referencia fueron: 0.02-0.74 mg/dl. Las concentraciones séricas de IL-6 se determinaron mediante ELISA de alta sensibilidad (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria), con un CV intra-ensayo de 6.9% y CV inter-ensayo de 8%. Las concentraciones séricas de sTNFR1 y sTNFR2 se evaluaron utilizando un inmunoensayo de sensibilidad enzimática amplificada en fase sólida (Biosource Europe S.A., Zoning Industriel B-6220, Fleunes, Belgium), con coeficientes de variación intra- e inter-ensayo inferiores a 8%.

Los marcadores óseos fueron determinados mediante las siguientes técnicas: la osteocalcina mediante un ensayo con enzima marcado inmunométrico

quimioluminiscente (Immulite 2000, Siemens Medical Solutions Diagnostics Ltd., Llanberis, U.K.), con una precisión para concentraciones medias entre 4.0 y 47.3 ng/ml de 4.8-3.2%. β -Crosslaps y total P1NP se determinaron mediante un inmunoensayo electroquimioluminiscente (Elecsys Modular Analytics E170, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany), con una precisión para concentraciones medias de β -Crosslaps entre 0.08 y 3.19 ng/ml de 4.6-1.0%, y una precisión para concentraciones medias de total P1NP entre 29.1 y 1027 ng/ml de 2.9-1.1%.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los datos cuantitativos están expresados como media y desviación estándar (distribución gaussiana) o como mediana y rango (distribución no gaussiana), y los datos cualitativos están expresados como porcentajes. La distribución de los datos se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre 2 grupos se hizo con la t de Student (distribución gaussiana) y la U de Mann-Whitney (distribución no gaussiana), y entre 3 grupos usando la ANOVA seguida del test de Bonferroni como test post-hoc o el test de Kruskal-Wallis, según la distribución de los datos. El test de Chi-cuadrado se utilizó para las variables categóricas.

En el **artículo I** se realizaron correlaciones bivariadas (coeficiente de correlación de Pearson) entre la masa grasa corporal, factores de riesgo cardiovascular y los marcadores de inflamación. Cuando se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, se consideraron como factores predictores potenciales de la masa grasa los siguientes: niveles de adipocitoquinas, la duración del hipercortisolismo endógeno, edad actual,

edad al diagnóstico del SC, IMC, perímetro de cintura, hipertensión arterial, insulina y HOMA.

En el **artículo II** se realizaron correlaciones bivariadas (Pearson) entre la masa ósea y la duración del tratamiento con GC, la dosis de GC, y la duración del hipercortisolismo endógeno. Al realizar un análisis de regresión lineal múltiple, se consideraron como factores predictores potenciales del CMO y DMO los siguientes: duración del tratamiento con GC, la dosis diaria de GC, la duración del hipercortisolismo endógeno, edad actual, edad al diagnóstico del SC, IMC, menopausia y otros déficits hormonales. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

1) Efectos del hipercortisolismo en el metabolismo (artículo I):

Tanto los pacientes con SC curados como los activos presentaban niveles más elevados de insulina en comparación con los controles, y una tendencia a mayor insulinoresistencia medida por el HOMA. Con respecto al perfil lipídico, sólo la Apoproteína B fue más elevada en pacientes con SC curado que en controles. Las cifras de tensión arterial sistólica fueron más elevadas en los pacientes con SC curados y activos que en los controles, y las cifras de tensión arterial diastólica más elevadas en pacientes con SC activos que en los otros 2 grupos (*Tabla 1, Anexo I*). Al analizar los criterios de síndrome metabólico de forma individual, se observó que los pacientes con SC curados y activos tenían más obesidad central que los controles (51% y 71% vs 31%, $p<0.01$), y más hipertensión (54% y 93% vs 29%, $p<0.001$) que los controles. Además, los pacientes con SC activo tenían más hipertensión que los pacientes curados. No se observaron diferencias entre grupos respecto al resto de componentes del síndrome metabólico. Más pacientes con SC activo cumplieron criterios de síndrome metabólico que los pacientes con SC curado y los controles (50% vs 16% y 11%, $p<0.01$).

2) Efectos del hipercortisolismo en la composición corporal y en la inflamación:

2.1. **Masa grasa y masa magra (artículo I):**

Al comparar los pacientes con SC con controles apareados por edad, sexo e IMC, se objetivó que los pacientes con SC curado tenían más masa grasa total y troncular que los controles. Aunque los pacientes con SC curado tenían menor masa magra que los controles, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (*Tabla 1, Anexo I*).

Los pacientes con SC tanto curados como activos tenían niveles de adiponectina inferiores y de sTNF-R1 e IL-6 superiores que los controles. No se observaron diferencias entre grupos respecto visfatina y sTNF-R2 (*Tabla 1, Anexo I*).

Al reanalizar los datos excluyendo los 10 pacientes que estaban en tratamiento sustitutivo con GC, se encontraron las mismas diferencias para grasa y adipoquinas.

Ya que los estrógenos juegan un papel muy importante en la composición corporal, los pacientes con SC curados y activos y los controles se dividieron en 2 grupos: el grupo estrógeno-suficiente (incluyendo mujeres premenopáusicas y menopáusicas en tratamiento hormonal sustitutivo) y el grupo estrógeno-deficiente (incluyendo mujeres menopáusicas y premenopáusicas sin tratamiento sustitutivo para el hipogonadismo). Al comparar los pacientes con SC curados y activos y los controles del grupo estrógeno-deficiente, se observó que los pacientes con SC curado tenían mayor masa grasa total y troncular, sTNF-R1, IL-6 y PA sistólica que los controles. Además, los pacientes curados tenían más sTNF-R1 y PA sistólica que los pacientes con SC activos (*Tabla 2, Anexo I*). No se observaron diferencias en el grupo estrógeno-suficiente con respecto a la composición corporal, pero los pacientes con SC curado tenían más sTNF-R1 y IL-6 que los controles, y los pacientes con SC activo más sTNF-R1 que los controles. En los pacientes con SC activo se observaron cifras más elevadas de PA sistólica y diastólica que en los pacientes curados y los controles (*Tabla 3, Anexo I*).

Al excluir los pacientes con déficit de GH sin tratamiento sustitutivo (N=5) y comparar los pacientes con SC curados y activos y controles, se observó que ambos grupos de pacientes con SC tenían más masa grasa troncular que los controles (40 ± 9 y 40.4 ± 7 vs 34.5 ± 8 , $p<0.01$). Además, los pacientes con SC curados y activos tenían niveles más elevados de sTNF-R1 e IL-6 que los controles [$1.6(1-4.2)$ y $1.6(1.1-2.1)$ vs $1.2(0.8-2.4)$, $p<0.001$; $0.5(0.07-11)$ y $0.4(0.15-6.7)$ vs $0.3(0.07-1.5)$, $p=0.001$; respectivamente] y

niveles más bajos de adiponectina en ambos grupos de pacientes comparado con los controles [12.4(5-32) y 12.6(8.2-26) vs 18.2(4.5-56.5), $p<0.05$].

Al comparar los pacientes con SC curados de origen hipofisario (N=27) con los de origen adrenal (N=10), no se observaron diferencias en la masa grasa, tensión arterial, edad actual, dosis o duración de la exposición a GC y porcentaje de pacientes con insuficiencia suprarrenal. De las adipoquinas, sólo la IL-6 fue mayor en los pacientes de origen hipofisario que en los de origen adrenal [0.6(0.26-1.1) vs 0.33(0.07-1.5), $p<0.05$].

Correlaciones entre masa grasa, factores de riesgo cardiovascular y marcadores de inflamación:

En los pacientes con SC curado, el porcentaje de masa grasa troncular correlacionó con sTNF-R1 ($r=0.559$, $p=0.001$), IMC ($r=0.783$, $p<0.001$), perímetro de la cintura ($r=0.795$, $p<0.001$), insulina ($r=0.358$, $p<0.05$), índice HOMA ($r=0.384$, $p<0.05$), edad actual ($r=0.542$, $p=0.001$) y PA sistólica ($r=0.427$, $p<0.01$) y diastólica ($r=0.502$, $p<0.01$). Tras realizar un análisis de regresión lineal múltiple, sólo el perímetro de la cintura (Beta: 0.689, $p<0.001$) y el sTNF-R1 (Beta: 0.314, $p<0.05$) persistieron relacionados de forma significativa a la masa grasa troncular (R^2 del modelo: 0.721). En los controles sanos, el sTNF-R1 correlacionó con la masa grasa troncular ($r=0.373$, $p<0.05$), pero tras ajuste por parámetros antropométricos, esta correlación perdió significado estadístico.

2.2. Hueso (artículo II):

Los pacientes con SC tanto curados como aquellos en fase activa tenían menos CMO y DMO total y lumbar que los controles apareados por edad, sexo e IMC. Los pacientes con SC activo tenían menos DMO lumbar que los controles. En ambos grupos de

pacientes con SC (curados y activos) la osteocalcina fue inferior comparada con los controles. No se encontraron diferencias significativas entre los 3 grupos respecto al porcentaje de mujeres postmenopáusicas, beta-Crosslaps y P1NP total (*Tabla 4, Anexo D*). Debido al importante papel que juegan los estrógenos en el hueso, tanto los pacientes con SC como los controles se dividieron en 2 grupos: el grupo estrógeno-suficiente (incluyendo mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas con tratamiento hormonal sustitutivo) y el grupo estrógeno-deficiente (incluyendo mujeres postmenopáusicas y premenopáusicas sin tratamiento sustitutivo para el hipogonadismo). Las mujeres con SC tanto curadas como activas del grupo estrógeno-suficiente tenían menos DMO total, DMO lumbar y CMO que los controles. Sin embargo, no hubieron diferencias entre las pacientes estrógeno-deficientes y sus respectivos controles (*Tabla 5, Anexo I*).

Cuando se excluyeron los pacientes con déficit de GH sin tratamiento sustitutivo (N=5), ambos grupos con SC (curados y activos) tenían menos CMO y DMO total que los controles (1.89 ± 0.31 y 1.79 ± 0.2 vs 2.05 ± 0.3 , $p<0.01$; 1.05 ± 0.09 y 1.02 ± 0.06 vs 1.11 ± 0.09 , $p<0.01$, respectivamente). Además, los pacientes con hipercortisolismo activo tenían menos DMO lumbar que los pacientes con SC curados y los controles (0.92 ± 0.1 vs 1.07 ± 0.18 y 1.11 ± 0.2 , $p<0.01$).

Correlaciones entre parámetros óseos y exposición a GC (endógena y exógena) en pacientes con SC curado:

Tanto la duración del tratamiento sustitutivo con GC como la duración del hipercortisolismo endógeno se correlacionaron negativamente con el CMO ($r= -0.587$, $p<0.001$; $r= -0.352$, $p<0.05$, respectivamente) y la DMO lumbar ($r= -0.509$, $p= 0.001$; $r= -0.419$, $p<0.05$, respectivamente). La dosis diaria de GC no se correlacionó con ninguno de los parámetros óseos. No se encontraron correlaciones significativas entre la

duración del tratamiento sustitutivo con GC o el hipercortisolismo endógeno y la DMO total y los marcadores óseos. Tras un análisis de regresión lineal múltiple, la duración del tratamiento con GC ($B = -0.002$, $p < 0.01$) y la edad al diagnóstico del SC ($B = -0.010$, $p < 0.05$) se relacionaron negativamente y el IMC ($B = 0.017$, $p < 0.05$) positivamente con el CMO (constante = 1.82, $R^2 = 0.57$); únicamente la duración del tratamiento con GC predijo de forma significativa la DMO lumbar ($B = -0.001$, $p = 0.001$, constante = 1.12, $R^2 = 0.27$).

La osteocalcina y el crosslaps se correlacionaron de forma significativa en los pacientes con SC curado ($r = 0.372$, $p < 0.05$) y en los controles ($r = 0.454$, $p < 0.001$), pero no en el grupo de SC activo ($r = 0.150$, $p = 0.61$).

Según la duración del tratamiento sustitutivo con GC, los pacientes se dividieron por tertiles en 3 grupos: < 7 meses de tratamiento ($N = 12$), entre 7 y 26 meses ($N = 14$) and > 26 meses ($N = 11$). Aquellos con mayor duración de tratamiento tenían menos CMO que los otros 2 grupos (1.65 ± 0.3 vs 2.03 ± 0.2 y 1.94 ± 0.3 , $p < 0.01$) (*Figura 1, Anexo I*), y menos DMO total que aquellos tratados durante menos de 7 meses (0.99 ± 0.1 vs 1.10 ± 0.06 , $p < 0.01$). No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre grupos respecto la DMO lumbar, IMC, edad actual, menopausia, déficits de hormonas hipofisarias, dosis de GC y la duración del hipercortisolismo endógeno. Aquellos con mayor duración del tratamiento sustitutivo con GC requirieron una segunda y tercera cirugías más frecuentemente que los otros 2 grupos (45% vs 8% y 7%; 18% vs 0); sin embargo, estos pacientes no necesitaron radioterapia más frecuentemente que aquellos con duración del tratamiento < 7 meses (36% vs 42%).

Cuando los pacientes curados con SC de origen hipofisario ($N = 27$) se compararon con aquellos que tenían un SC de origen adrenal ($N = 10$) no se encontraron diferencias significativas respecto a los diferentes parámetros óseos o la dosis y duración de la

exposición a GC. Los pacientes con SC de origen hipofisario tenían mayor duración de hipercortisolismo endógeno que aquellos con SC de origen adrenal [66.5 meses (15.1-241) vs 27.6 meses (13.3-89); $p < 0.01$].

DISCUSIÓN

Persistencia de alteraciones metabólicas después de la curación a largo plazo del

SC:

Se ha demostrado en un estudio reciente realizado en pacientes con SC que, a pesar de la curación del hipercorticismismo, la hipertensión arterial, el cHDL bajo, la diabetes mellitus y la resistencia a la insulina pueden persistir hasta 5 años después de la curación (15). En nuestro estudio también observamos persistencia de una serie de alteraciones metabólicas a pesar de haber pasado una media de 11 años después de la resolución del hipercortisolismo: nuestros pacientes continúan teniendo más insulinemia, una tendencia a mayor insulinoresistencia medida por el índice HOMA, más apoproteína B y cifras más elevadas de tensión arterial sistólica que la población control. No existe mayor número de pacientes con SC curado que cumplen criterios de síndrome metabólico en comparación con el grupo control; sin embargo, cuando se analiza cada criterio de forma individual, comprobamos que los pacientes con SC curado tienen más obesidad central y más hipertensión arterial que los controles.

Persistencia de una composición corporal anómala después de la curación a largo plazo del SC:

De todos es conocida la alteración de la composición corporal en pacientes con SC en fase activa de la enfermedad, presentan aumento de la masa grasa, en especial la troncular, y disminución de la masa magra y masa ósea (16-20). Sin embargo, poco se conoce acerca de la composición corporal una vez que la enfermedad lleva años en remisión. Se asumía que tras la normalización de los niveles de cortisol existía una recuperación de todas estas alteraciones. En los artículos I y II por primera vez se demuestra que en pacientes con antecedente de SC persiste un incremento de la masa

grasa (**artículo I**) y una disminución de la masa ósea (**artículo II**), a pesar de una media de 11 años después de conseguir la curación.

Se había descrito un aumento de la masa grasa total y central en pacientes con SC curado cuya enfermedad había empezado en la niñez o adolescencia (47,48). Sin embargo, en nuestro estudio (**artículo I**) sólo 1 paciente inició los síntomas a la edad de 9 años, el resto se diagnosticó en la edad adulta.

Algunos estudios han descrito una normalización de la densidad mineral ósea tras la curación del SC. Uno de ellos describió una normalización de la DMO en varios compartimentos del esqueleto de pacientes con SC endógeno después de 6 años de curación (23). Otro reportó una recuperación completa de la DMO una media de 9 años después de la curación del SC (24). Otro estudio describió un aumento del riesgo de fractura en pacientes con SC en los 2 años anteriores al diagnóstico pero no después del diagnóstico y tratamiento (25). Sin embargo, en nuestro estudio (**artículo II**) se describe persistencia de un CMO y DMO más bajos, a pesar de una media de 11 años de remisión del SC. Varias razones podrían explicar estos resultados discordantes: primero, nosotros sólo hemos incluido mujeres, mientras que los otros estudios incluyeron ambos sexos; segundo, la duración media del hipercortisolismo endógeno era de 6 años en nuestros pacientes comparado con los 3 años del artículo de Manning, y no mencionado en el artículo de Kristo; finalmente, la duración del tratamiento con GC, uno de los principales predictores de la persistencia a largo plazo de anomalías en la masa ósea en nuestros pacientes, no se mencionó en esos estudios. Otros, sin embargo, han descrito una recuperación incompleta de la masa ósea después de la curación del SC, aunque los periodos de seguimiento eran muy inferiores al nuestro: 2 y 3 años, respectivamente (26,27). En otro estudio, se mostró a través de radiografías, un aumento de la prevalencia de daño vertebral en pacientes con SC curado después de una media

de 4 años (28). Aunque algunos estudios han descrito mayor pérdida ósea en pacientes con SC de origen adrenal que en los de origen hipofisario (49,50), nuestro estudio, junto con otros (51), no han encontrado estas diferencias.

En la fase activa del SC y también en tratamientos prolongados con GC se ha descrito una reducción en los niveles de osteocalcina (52), observándose un aumento de dichos niveles tras el tratamiento curativo del SC (23,53). Sin embargo, en nuestro estudio, los pacientes con SC curado todavía presentaban niveles más bajos de osteocalcina que los controles, sugiriendo que la reducción persistente en la actividad osteoblástica puede ser uno de los mecanismos relacionados con la ausencia de recuperación de la DMO. Una posible explicación de la reducción de la actividad osteoblástica a pesar de la curación del SC puede ser la hiperactivación de la enzima 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 1 dentro de los osteoblastos (convierte la cortisona inactiva en cortisol activo) (54). Estudios recientes han demostrado que la actividad de la 11 β -HSD1 de los osteoblastos aumenta con la edad y la exposición a glucocorticoides (55). Respecto a otros marcadores menos específicos de formación ósea como el P1NP y marcadores de resorción como Crosslaps, se han encontrado niveles de ambos marcadores reducidos (52) o bien normales (27,56), como en nuestro caso. Se ha descrito una falta de correlación entre marcadores de formación y resorción ósea en pacientes con SC activo (57), restableciéndose dicha correlación tras el tratamiento curativo del SC (23), indicando la recuperación del proceso de remodelación ósea. En nuestro estudio, aunque no existía correlación entre osteocalcina y Crosslaps en pacientes con SC activo, sí que la había en pacientes con SC curado y controles. A pesar del restablecimiento del recambio óseo en nuestros pacientes con SC curado, la masa ósea no se normalizó tras 11 años de remisión del hipercortisolismo. Por tanto, el tratamiento con bifosfonatos podría ser útil en este grupo de pacientes; se ha descrito que el tratamiento con

alendronato en el SC curado puede inducir una mejoría más rápida de la masa ósea que sólo la normalización del cortisol (58).

Diferentes mecanismos pueden explicar la persistencia del aumento de grasa troncular. En uno de ellos interviene la enzima 11 β -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 1, la cual está presente en gran cantidad en el tejido adiposo visceral. Esta enzima convierte la cortisona inactiva en cortisol activo. El cortisol estimula la diferenciación de más preadipocitos a adipocitos, por tanto, cuando el hipercortisolismo desaparece, persiste el aumento de células grasas, lo que puede contribuir a explicar la persistencia del aumento de los depósitos grasos abdominales (54,59,60). Otro mecanismo que puede estar implicado es la disregulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. Existen evidencias de que una hiperactivación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, como resultado de una reacción crónica al estrés puede conllevar una distribución visceral de la grasa corporal y a otras manifestaciones del síndrome metabólico (6,7).

Otro mecanismo novedoso que puede explicar el depósito de tejido graso visceral con la consiguiente obesidad central en pacientes con SC iatrógeno o endógeno, es la inhibición de la actividad de la proteína kinasa AMP-activada en el tejido adiposo por parte de los glucocorticoides. Esta inhibición conlleva un aumento de los almacenes lipídicos con mejoría de la lipólisis, dando lugar a la liberación de ácidos grasos libres (61). De hecho, se ha sugerido que la metformina podría ser un tratamiento potencial para prevenir o tratar la acumulación de tejido adiposo visceral en pacientes con SC endógeno o iatrogénico, ya que la metformina revierte el efecto inhibitor de los GC sobre la proteína kinasa AMP-activada (61).

Diferencias según el nivel estrogénico en la composición corporal en mujeres con SC curado:

En el **artículo I** se muestra como las mujeres con SC curado y estrógeno-deficientes tienen más grasa total y troncular que el grupo control, sin observarse estas diferencias en el grupo estrógeno-suficiente. En el **artículo II** se muestra, sin embargo, como las mujeres con SC curado y estrógeno-suficientes tienen menos CMO y DMO que sus respectivos controles, no observándose estas diferencias en el grupo de estrógeno-deficientes.

Estas diferencias implican que en las mujeres postmenopáusicas, que ya han perdido el efecto protector de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular, al tener mayor masa grasa relacionada con su SC previo, condicionaría incluso un mayor riesgo cardiovascular en estas mujeres. Se ha de remarcar que el hecho de encontrar estas diferencias solo en las mujeres estrógeno-deficientes puede condicionar los resultados en el grupo total. Por tanto, el déficit de estrógenos en estas pacientes que han padecido un SC parece jugar un papel primordial en la persistencia de la acumulación grasa.

Según algunos estudios el SC parece causar un mayor daño óseo en mujeres postmenopáusicas que premenopáusicas (62). Sin embargo, en nuestro estudio (**artículo II**) y en otros (51,63), sugieren que el efecto protector de los estrógenos en el hueso se pierde en el SC. Nuestros resultados apoyan la idea que esta pérdida ósea en el grupo estrógeno-suficiente es causada por los efectos negativos del exceso de GC en el hueso.

Efecto del hipercortisolismo endógeno y exógeno en la composición corporal en mujeres con SC curado:

Existen datos contradictorios acerca del efecto sobre el hueso del tratamiento sustitutivo crónico con GC; mientras en un estudio realizado a pacientes con insuficiencia

suprarrenal con más de 5 años de tratamiento sustitutivo con GC no se observaron diferencias respecto DMO entre pacientes y controles, y tampoco se encontró correlación entre la duración o dosis del tratamiento con GC (29); en otros estudios realizados en pacientes con déficit de 21-hidroxilasa sí que se objetivó menos DMO en los pacientes comparado con los controles, sin correlación con la dosis de GC (30,31). En nuestro estudio tampoco se encontró correlación con la dosis diaria de GC, lo cual contrasta con otro estudio que mostraba una relación entre el riesgo de fractura y la dosis diaria de GC en una cohorte de pacientes que requerían tratamiento con GC orales (64). Esto se puede explicar por el hecho de que la dosis del tratamiento sustitutivo con GC en pacientes con insuficiencia suprarrenal tras tratamiento curativo del SC es una dosis estándar y más baja, aproximadamente 20 mg/día de hidrocortisona.

En los pacientes con SC muy a menudo tras la cirugía curativa pasan por una fase de insuficiencia suprarrenal requiriendo tratamiento sustitutivo con GC durante un periodo variable de tiempo, en ocasiones, de por vida. En nuestro estudio (**artículo II**) se muestra que tanto la duración del hipercortisolismo endógeno como la duración del tratamiento sustitutivo con GC se correlacionan de forma negativa con el CMO y DMO lumbar, pero es el tratamiento sustitutivo con GC el que tiene un mayor peso como factor predictor de la disminución de la masa ósea. Cabría esperar que la duración del hipercortisolismo endógeno (media de 6 años) sería un mejor predictor de la masa ósea que la duración del tratamiento con GC (media de 3.5 años). Sin embargo, conviene recordar que cuando se realiza el diagnóstico de SC los pacientes son tratados con fármacos que disminuyen los niveles de cortisol, como metopirona y/o ketoconazol, hasta que se puede realizar la cirugía. A pesar de que el hipercortisolismo mejora con dichos fármacos no se puede considerar que el paciente está curado hasta que se realiza la cirugía y se obtienen los criterios de curación. Por tanto, la duración del

hipercortisolismo pre-diagnóstico (media de 4 años) parece ser más dañino para el hueso que el de después del diagnóstico, y tiene una duración similar a la del tratamiento sustitutivo postoperatorio con GC (3.5 años). Sin embargo, tras el análisis de regresión incluyendo la duración del hipercortisolismo pre-diagnóstico, la duración del tratamiento con GC persistía como el principal predictor del CMO bajo. Es más, aquellos pacientes con mayor duración del tratamiento con GC tienen menos CMO y DMO que aquellos pacientes con menor duración del tratamiento. Cabría esperar que los pacientes que requirieron un periodo de tratamiento con GC más largo fueran aquéllos con características diferentes (severidad de la enfermedad o tratamiento). Es cierto que precisaron más veces una segunda y una tercera cirugía que aquéllos con un periodo más corto de tratamiento, lo cual puede sugerir que se trata de una enfermedad más “resistente”. Sin embargo, otra explicación podría ser la mejoría del resultado quirúrgico, ya que los mismos dos neurocirujanos practicaron todas las cirugías hipofisarias en nuestro hospital desde 1982. Como habíamos descrito anteriormente (65), uno de los principales predictores del resultado neuroquirúrgico en los adenomas hipofisarios fue la fecha de la operación (OR= 0.40 para la neurocirugía practicada hasta 1991), sugiriendo que la experiencia del neurocirujano juega un papel importante. La mayoría de los pacientes del grupo de mayor duración del tratamiento con GC se habían operado antes de 1992 (62.5%) comparado con los de menor duración del tratamiento (25%); por tanto, la menor experiencia neuroquirúrgica podría explicar que los pacientes con mayor duración del tratamiento con GC requirieron una segunda y tercera cirugía más frecuentemente.

El tratamiento sustitutivo con GC en pacientes con SC curado no interviene como factor predictor en el aumento de masa grasa. Tampoco hay diferencias significativas respecto

a la masa grasa cuando se comparan pacientes con mayor y menor periodo de tratamiento con GC.

Por tanto, en los pacientes con SC curado, no sólo la duración del hipercortisolismo endógeno afecta negativamente el hueso, sino que también hay que tener presente el efecto negativo adicional en aquellos pacientes que requieren o han requerido tratamiento sustitutivo con GC por insuficiencia suprarrenal tras la cirugía curativa.

Persistencia de un patrón anómalo en la secreción de adipoquinas después de la curación a largo plazo del SC:

Se han descrito cambios en el patrón de secreción de adipoquinas en situaciones como la obesidad, como son un aumento del TNF α y la IL-6, entre otros, y una reducción de la adiponectina (34). Sin embargo, no existen datos sobre los niveles de adipoquinas en el SC tras curación a largo plazo. Un estudio reciente en el que se incluían un escaso número de pacientes con SC activo se objetivó que los niveles de resistina fueron mayores en las pacientes comparadas con el grupo control, pero no se encontraron diferencias en los niveles de adiponectina; un subgrupo de estos pacientes fueron reevaluados a corto plazo (9 meses después de la cirugía curativa), y no se observaron diferencias entre los niveles de resistina ni adiponectina basales y postquirúrgicos (66). En otro estudio se describieron niveles más bajos de adiponectina en pacientes no obesos con SC activo comparados con controles no obesos (67). En otro estudio realizado en pacientes con SC activo se describe una aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias IL-8 y IL-18 (68). Por tanto, nuestro estudio es el primero en demostrar una persistencia de la alteración en el patrón de secreción de adipoquinas en pacientes con SC después de una media de 11 años desde la normalización del hipercortisolismo; concretamente, una persistencia de niveles aumentados de sTNF-R1

e IL-6 y niveles más bajos de adiponectina. Esto conlleva a que el SC a pesar de estar en remisión sea considerado como un estado de inflamación de bajo grado. Dicho “estado de inflamación” puede determinar daño vascular y por tanto, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. En pacientes obesos se ha descrito una mejoría del patrón anómalo de secreción de adipoquinas con la pérdida de peso (69,70). Sin embargo, en nuestros pacientes con SC curado, a pesar de llevar tiempo curados, persisten el aumento de grasa central y el patrón anómalo de adipoquinas, como en los pacientes con SC activo. En nuestros pacientes con SC curado, el sTNF-R1 fue la adipoquina que se correlacionó de forma positiva con la masa grasa central y se mantuvo su significancia después de hacer un ajuste por parámetros antropométricos. Por tanto, los niveles de sTNF-R1 pueden ser el nexo de unión entre la masa grasa central y la persistencia del aumento del riesgo cardiovascular en pacientes con largo tiempo de curación del SC.

Todas estas alteraciones que hemos visto a pesar de la curación del SC, como son la persistencia de alteraciones metabólicas, una composición corporal anómala, y un patrón anómalo en la secreción de adipoquinas, conllevan un aumento del riesgo cardiovascular en estos pacientes. De hecho, la mortalidad en nuestra serie fue del 5% (**Anexo II**), con un 60% de las muertes de origen cardiovascular, y un 60% en pacientes con SC ya curado (tuvieron el cortisol normal durante una media de 9.5 años hasta el momento del fallecimiento). Estos datos resultan chocantes teniendo en cuenta que se trataba de una población relativamente joven, con una edad media en el momento del fallecimiento de 49 años. Al analizar la morbilidad cardiovascular durante los años de seguimiento se observaron episodios cardiovasculares en el 14% de los pacientes, muchos de ellos con un SC ya curado (**Anexo II**). Por tanto, en pacientes con antecedente de SC, a pesar de llevar años en remisión, persiste el daño vascular, el cual

puede estar mediado por la persistencia de una composición corporal anómala con el consiguiente patrón desfavorable en la secreción de adipoquinas (*Figura 2, Anexo II*).

CONCLUSIONES FINALES

Los pacientes con SC, a pesar de curación a largo plazo, presentan una serie de alteraciones similares a las de la fase activa de la enfermedad:

- Persistencia de una composición corporal anómala: aumento de la masa grasa principalmente abdominal y una disminución de la masa y densidad mineral óseas.
- Persistencia de un patrón anómalo en la secreción de adipocinas (condicionado por el aumento de adiposidad abdominal), con un aumento de moléculas con actividad inflamatoria como la IL-6 y el TNF α , y una disminución de la adiponectina, molécula de actividad antiinflamatoria. Este perfil desfavorable en pacientes con SC curado condicionaría una situación de inflamación crónica de bajo grado, que provocaría daño vascular, aterosclerosis y enfermedad cardiovascular.
- Persistencia de alteraciones metabólicas (en la que juega un papel importante la situación de inflamación), como la hipertensión arterial, insulinoresistencia y aumento de los niveles de apoproteína B. Los pacientes con SC curado no presentan más síndrome metabólico que los controles, aunque analizando cada criterio de forma individual, se observa que los pacientes con SC curado tienen más obesidad central y más hipertensión arterial que los controles.

- No sólo el hipercortisolismo endógeno tiene efectos negativos sobre la composición corporal, sino también el tratamiento sustitutivo con glucocorticoides exógenos (en concreto, efectos negativos sobre el hueso), tratamiento que en muchas ocasiones se debe administrar a estos pacientes cuando la cirugía ha sido un éxito. Se ha observado que a mayor duración del tratamiento sustitutivo con GC, menor masa ósea.

Todos estos hallazgos hacen que tengamos que considerar al SC, aunque curado, como una situación de elevado riesgo cardiovascular. Por tanto, resulta de vital importancia en estos pacientes:

- Controlar de forma agresiva los factores de riesgo cardiovascular (mediante antiagregación, estatinas, antihipertensivos).
- Realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad para acortar en lo posible el tiempo de hipercortisolismo endógeno, y en aquellos pacientes que precisen tratamiento sustitutivo con glucocorticoides tras la cirugía, asegurar la menor dosis y durante el menor tiempo posible.
- En aquellos pacientes con disminución de la masa y densidad mineral óseas administrar tratamiento con bifosfonatos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- **Etxabe J, Vazquez JA** 1994 Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 479-484
- 2- **Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman L** 2006 Cushing's syndrome. *Lancet* 367: 1605-1617
- 3- **Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G, Colao A** 2005 The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin N Am* 34: 327-339
- 4- **Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, Passini E, Bottasso B, Federici A** 2000 Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108: 294-298
- 5- **Andrews RC, Walker BR** 1999 Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci* 96: 513-523.
- 6- **Chrousos GP** 2000 The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrin and target tissue-related causes. *Int J Obes* 24 (suppl 2): S50-55
- 7- **Rosmond R, Björntorp P** 2000 Occupational status, cortisol secretory pattern and visceral obesity in middle-aged men. *Obes Res* 8: 445-450.
- 8- **Plotz CM, Knowlton AI, Ragan C** 1952 The natural history of Cushing's syndrome. *Am J Med* 3: 597-614
- 9- **Welbourn RB** 1985 Survival and causes of death after adrenalectomy for Cushing's disease. *Surgery* 97: 16-20

- 10- **Bochicchio D, Losa M, Buchfelder M and the European Cushing's disease Survey Group** 1995 Cushing's disease treated by transsphenoidal surgery: a retrospective study by the European Cushing's disease Survey Group. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 3114-3120
- 11- **Cavagnini F, Pecori-Giraldi F** 2001 Epidemiology and follow-up of Cushing's disease. *Ann Med* 62: 168-172
- 12- **Rees DA, Hanna FW, Davies JS, Mills RG, Vafidis J, Scanlon MF** 2002 Long-term follow-up results of transsphenoidal surgery for Cushing's disease in a single center using strict criteria for remission. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56: 541-551
- 13- **Swearingen B, Biller B, Barker F, Katznelson L, Grinspoon S, Klibanski A, Zervas N** 1999 Long-term mortality after transsphenoidal surgery for Cushing disease. *Ann Intern Med* 130: 821-824
- 14- **Pikkarainen L, Sane T, Reunanen A** 1999 The survival and well-being of patients treated for Cushing's syndrome. *J Intern Med* 245: 463-468
- 15- **Colao A, Pivonello R, Spiezia S, Faggiano A, Ferone D, Filippella M, Marzullo P, Cerbone G, Siciliani M, Lombardi G** 1999 Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2664-2672
- 16- **Burt MG, Gibney J, Ho KK** 2006 Characterization of the metabolic phenotypes of Cushing's syndrome and growth hormone deficiency: a study of body composition and energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64: 436-443
- 17- **Shaker JL, Lukert BP** 2005 Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin N Am* 34: 341-356
- 18- **Canalis E, Giustina A** 2001 Glucocorticoid-induced osteoporosis: Summary of a workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5681-5685

- 19- **Chiodini I, Torlontano M, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A** 2008 Skeletal involvement in adult patients with endogenous hypercortisolism. *J Endocrinol Invest* 31: 267-276
- 20- **Mancini T, Doga M, Mazziotti G, Giustina A** 2004 Cushing's syndrome and bone. *Pituitary* 7: 243-246
- 21- **Ueland T, Kristo C, Godang K, Aukrust P, Bollerslev J** 2003 Interleukin-1 receptor antagonist is associated with fat distribution in endogenous Cushing's syndrome: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1492-1496
- 22- **Pirlich M, Biering, Gerl H, Ventz M, Schmidt B, Ertl S, Lochs H** 2002 Loss of body cell mass in Cushing's syndrome: effect of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1078-1084
- 23- **Kristo C, Jemtland R, Ueland T, Godang K, Bollerslev J** 2006 Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing's syndrome: A prospective, long-term study. *Eur J Endocrinol* 154: 109-118
- 24- **Manning PJ, Evans MC, Rei IR** 1992 Normal bone mineral density following cure of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 36: 229-234
- 25- **Vestergaard P, Lindholm J, Jorgensen JOL, Hagen C, Hoeck HC, Laurberg P, Rejnmark L, Brixen K, Kristensen L, Feldt-Rasmussen U, Mosekilde L** 2002 Increased risk of osteoporotic fractures in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 146: 51-56
- 26- **Di Somma C, Pivonello R, Loche S, Faggiano A, Klain M, Salvatore M, Lombardi G, Colao A** 2003 Effect of 2 years of cortisol normalization on the impaired bone mass and turnover in adolescent and adults patients with Cushing's disease: a prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58: 302-308

- 27- **Hermus AD, Smals AG, Swinkels LM, Huysmans DA, Pieters GF, Sweep CF, Corstens FH, Kloppenborg PW** 1995 Bone mineral density and bone turnover before and after surgical cure of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2859-2865
- 28- **Faggiano A, Pivonello R, Filippella M, Di Somma C, Orio F, Lombardi G, Colao A** 2001 Spine abnormalities and damage in patients cured from Cushing's disease. *Pituitary* 4: 153-161
- 29- **Arlt W, Rosenthal C, Hahner S, Allolio B** 2006 Quality of glucocorticoid replacement in adrenal insufficiency: clinical assessment vs timed serum cortisol measurements. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64: 384-389
- 30- **King JA, Wisniewski AB, Bankowski BJ, Carson KA, Zacur HA, Migeon CJ** 2006 Long-term corticosteroid replacement and bone mineral density in adult women with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 865-869
- 31- **Sciannamblo M, Russo G, Cuccato D, Chiumello G, Mora S** 2006 Reduced bone mineral density and increased bone metabolism rate in young adult patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4453-4458
- 32- **Crown A, Lightman S** 2005 Why is the management of glucocorticoid deficiency still controversial: a review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63: 483-492
- 33- **Lukert BP** 2006 Editorial: Glucocorticoid replacement-How much is enough?. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 793-794
- 34- **Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E** 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64: 355-365
- 35- **Trujillo ME, Scherer PE** 2006 Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27: 762-778

- 36- **Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, Richart C** 1998 Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 47: 1757-1762
- 37- **Santaniemi M, Kesäniemi YA, Ukkola O** 2006 Low plasma adiponectin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 155: 745-150
- 38- **Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y; Osaka CAD Study Group** Coronary artery disease 2003 Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:85-89
- 39- **Frystyk J, Berne C, Berglund L, Jensevik K, Flyvbjerg A, Zethelius B** 2007 Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 571-576
- 40- **Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M** 2003 Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 108: 2317-2322.
- 41- **Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB** 2004 Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 16: 2599-2610
- 42- **Mancini T, Kola B, Mantero F, Boscaro M, Arnaldi G** 2004 High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61: 768-777

- 43- **Mosteller RD** 1987 Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317: 1098.
- 44- **Webb SM, Rigla M, Wagner AM, Oliver B, Bartumeus F** 1999 Recovery of hypopituitarism after neurosurgical treatment of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3696-3700
- 45- **National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel** 2002 Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106: 3143-3421
- 46- **Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, Costa F** 2005 Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 2735-2752
- 47- **Abad V, Chrousos GP, Reynolds JC, Nieman LK, Hill SC, Weinstein RS, Leong GM** 2001 Glucocorticoid excess during adolescence leads to a major persistent deficit in bone mass and an increase in central body fat. *J Bone Miner Res* 16: 1879-1885
- 48- **Leong GM, Abad V, Charmandari E, Reynolds JC, Hill S, Chrousos GP, Nieman LK** 2007 The effects of child-and adolescent-onset endogenous Cushing syndrome on bone mass, body composition and growth: a 7-year prospective study into young adulthood. *J Bone Miner Res* 22: 110-118
- 49- **Minetto M, Reimondo G, Osella G, Ventura M, Angeli A, Terzolo M** 2004 Bone loss is more severe in primary adrenal than in pituitary-dependent Cushing's syndrome. *Osteoporos Int* 15: 855-861

- 50- **Ohmori N, Nomura K, Ohmori K, Kato Y, Itoh T, Takano K** 2003 Osteoporosis is more prevalent in adrenal than in pituitary Cushing's syndrome. *Endocr J* 50: 1-7
- 51- **Tauchmanová L, Pivonello R, Di Somma C, Rossi R, De Martino MC, Camera L, Klain M, Salvatore M, Lombardi G, Colao A** 2006 Bone demineralization and vertebral fractures in endogenous cortisol excess: role of disease etiology and gonadal status. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1779-1784
- 52- **Piovesan A, Terzolo M, Reimondo G, Pia A, Codegone A, Osella G, Boccuzzi A, Paccotti P, Angeli A** 1994 Biochemical markers of bone and collagen turnover in acromegaly or Cushing's syndrome. *Horm Metab Res* 26: 234-237
- 53- **Sartorio A, Ambrosi B, Colombo P, Morabito F, Faglia G** 1988 Osteocalcin levels in Cushing's disease before and after treatment. *Horm Metab Res* 20: 70
- 54- **Stewart PM** 2003 Tissue-specific Cushing's syndrome, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action. *Eur J Endocrinol* 149: 163-168
- 55- **Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM** 2002 Osteoblastic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res* 17: 979-986
- 56- **Osella G, Terzolo M, Reimondo G, Piovesan A, Pia A, Termine A, Paccotti P, Angeli A** 1997 Serum markers of bone and collagen turnover in patients with Cushing's syndrome and in subjects with adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3303-3307
- 57- **Godang K, Ueland T, Bollerslev J** 1999 Decreased bone area, bone mineral content, formative markers, and increased bone resorptive markers in endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 141: 126-131

- 58- **Di Somma C, Colao A, Pivonello R, Klain M, Faggiano A, Tripodi FS, Merola B, Salvatore M, Lombardi G** 1998 Effectiveness of chronic treatment with alendronate in the osteoporosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48: 655-662
- 59- **Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM** 2004 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *End Rev* 25: 831-866
- 60- **Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM** 1997 Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 349: 1210-1213
- 61- **Kola B, Christ-Crain M, Lolli F, Arnaldi G, Giacchetti G, Boscaro M, Grossman AB, Korbonits M** 2008 Changes in AMP-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4969-4973
- 62- **Karavitaki N, Ioannidis G, Giannakopoulos F, Mavrokefalos P, Thalassinou N** 2004 Evaluation of bone mineral density of the peripheral skeleton in pre- and postmenopausal women with newly diagnosed endogenous Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 264-270
- 63- **Chiodini I, Carnevale V, Torlontano M, Fusilli S, Guglielmi G, Pileri M, Modoni S, Di Giorgio A, Liuzzi A, Minisola S, Cammisà M, Trischitta V, Scillitani A** 1998 Alterations of bone turnover and mass at different skeletal sites due to pure glucocorticoid excess: study in eumenorrheic patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1863-1867
- 64- **Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C** 2000 Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology* 39: 1383-1389

- 65- **Barahona MJ, Sojo L, Wagner AM, Bartumeus F, Oliver B, Cano P, Webb SM**
2005 Determinants of neurosurgical outcome in pituitary tumors. *J Endocrinol Invest* 28: 787-794
- 66- **Krsek M, Silha JV, Jezková J, Hana V, Marek J, Weiss V, Stepan JJ, Murphy LJ** 2004 Adipokine levels in Cushing´s syndrome; elevated resistin levels in female patients with Cushing´s syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60: 350-357
- 67- **Fallo F, Scarda A, Sonino N, Paoletta A, Boscaro M, Pagano C, Federspil G, Vettor R** 2004 Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing´s syndrome. *Eur J Endocrin* 150: 339-344
- 68- **Kristo C, Godang K, Ueland T, Lien E, Aukrust P, Froland SS, Bollerslev J**
2002 Raised serum levels of interleukin-8 and interleukin-18 in relation to bone metabolism in endogenous Cushing´s syndrome. *Eur J Endocrin* 146: 389-395
- 69- **Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F, Vendrell J, Valera Mora ME, Nanni G, Tondolo V, Calvani M, Ricart W, Castagneto M, Mingrone G** 2007 Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 483-490
- 70- **Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D´Andrea F, Molinari AM, Giugliano D** 2002 Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 105: 804-809

PUBLICACIONES

- **Artículo I:** Persistent body fat mass and inflammatory marker increases after long-term cure of Cushing's syndrome
- **Artículo II:** Deleterious effects of glucocorticoid replacement on bone in women after long-term remission of Cushing's syndrome

Persistent Body Fat Mass and Inflammatory Marker Increases after Long-Term Cure of Cushing's Syndrome

María-José Barahona, Nuria Sucunza, Eugenia Resmini, José-Manuel Fernández-Real, Wifredo Ricart, José-María Moreno-Navarrete, Teresa Puig, Jordi Farrerons, and Susan M. Webb

Endocrinology and Medicine Departments and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER, Unidad 747), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, and Hospital Sant Pau (M.-J.B., N.S., E.R., S.M.W.), Universitat Autònoma de Barcelona, 08025 Barcelona, Spain; Endocrinology Department (J.-M.F.-R., W.R., J.-M.M.-N.), Institut d'Investigació Biomèdica de Girona and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutrición CB06/03/010, Hospital Josep Trueta, 17007 Girona, Spain; and Departments of Epidemiology (T.P.) and Internal Medicine (J.F.), Hospital Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, 08025 Barcelona, Spain

Objective: Although increased central fat mass is characteristic of active Cushing's syndrome (CS), little is known about body composition and secretion of adipokines after long-term recovery of CS. The aim of this study was to evaluate central fat mass and its correlation with adipokines and cardiovascular risk factors in patients after long-term remission of CS.

Methods: Thirty-seven women with CS in remission (27 of pituitary and 10 of adrenal origin; mean age, 50 ± 14 yr; mean time of hormonal cure, 11 ± 6 yr) were enrolled and compared to 14 women with active CS and 85 gender-, age-, and body mass index-matched healthy controls. Total and trunk fat mass were measured by dual-energy x-ray absorptiometry scanning. Laboratory parameters and adipokine levels [including adiponectin, visfatin, soluble TNF α -receptor 1 (sTNF-R1), sTNF-R2, and IL-6] were measured.

Results: Cured CS patients had more total and trunk fat mass than controls. Cured and active CS had higher levels of sTNF-R1 and IL-6 and lower adiponectin levels than controls. Higher insulin levels and blood pressure in both groups of CS patients and higher apolipoprotein B in cured CS were observed compared to controls. sTNF-R1 correlated positively with percentage of trunk fat mass and remained significant after adjusting for anthropometric parameters.

Conclusion: Despite long-term cure, patients who have suffered CS exhibit persistent accumulation of central fat, as in active hypercortisolemia, with the consequent unfavorable adipokine profile, leading to a state of low-grade inflammation. This situation determines a persistent and increased cardiovascular risk in these patients. (*J Clin Endocrinol Metab* 94: 3365–3371, 2009)

Any chronic glucocorticoid (GC) excess exerts important changes in body composition, reducing bone mass and lean body mass and favoring central fat accumulation (1, 2). It has been assumed that resolution of hypercortisolism is followed by normalization of body composition; a decrease in fat mass has been reported in

the early recovery after successful treatment of Cushing's syndrome (CS) (3, 4). However, patients who have suffered from CS, either exogenous or endogenous, often complain of obesity, despite successful treatment that may even have rendered them adrenal insufficient. Persistence of increased cardiovascular risk and carotid

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2009 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-0766 Received April 8, 2009. Accepted June 1, 2009.

First Published Online June 9, 2009

Abbreviations: ApoB, Apolipoprotein B; BMI, body mass index; BP, blood pressure; CS, Cushing's syndrome; CV, coefficient of variation; DEXA, dual-energy x-ray absorptiometry; GC, glucocorticoid; HDL-c, high-density lipoprotein-cholesterol; HOMA, homeostasis model assessment; LDL-c, low-density lipoprotein-cholesterol; sTNF-R, soluble TNF α -receptor.

atherosclerosis has been reported in patients with CS after 5 yr of cure (5). However, no data are available on adipokines and inflammatory markers in patients with CS after long-term cure. Adipokines, secreted by adipose tissue, have effects on inflammation, atherosclerosis, and insulin resistance and could be the link between adiposity and cardiovascular disease (6, 7). Plasma levels of IL-6, soluble TNF α -receptor 1 (sTNF-R1), and sTNF-R2 correlate positively, and adiponectin correlates negatively with body fat and insulin resistance (8, 9). These adipokines are significantly related to an increased risk of coronary heart disease (10–13).

The aim of this study was to evaluate body fat mass and its correlation with adipokines and cardiovascular risk factors in patients with CS after a mean of 11 yr of successful control of endogenous hypercortisolism.

Subjects and Methods

Subjects

In this case-control study, patients with endogenous CS followed in our institution since 1982 were eligible. Patients with adrenal carcinomas were excluded due to their worse prognosis. A total of 96 CS patients were identified. Of these, five had died and 30 were lost to follow-up (including patients from other regions of Spain who, after successful operation, were in remission of hypercortisolism and were followed by their previous physicians). Of the remaining patients, 10 were men and were excluded, given the small number of cases and the heterogeneity of the sample. At the time of the study, 14 women were hypercortisolemic (four of which had recurred, 13 of pituitary origin, and one of adrenal origin), and 37 were in remission (27 of pituitary and 10 of adrenal origin) and were included in this study. All patients signed an informed consent after study approval by the hospital ethics committee. In cured CS, mean age at the time of study was 50 ± 14 yr, whereas mean age at the time of CS diagnosis was 36 ± 12 yr; mean time of hormonal cure since normalization of cortisol to study date was 11 ± 6 yr (range, 0.7 to 22 yr). Only one patient developed symptoms at the age of 9 yr, whereas the others started in adulthood. Unilateral adrenalectomy was performed in the patients with adrenal adenomas, except in one that required bilateral adrenalectomy. Twenty-six patients of pituitary origin underwent transsphenoidal surgery, and one had undergone initial bilateral adrenalectomy. Seven patients required a second surgery (six transsphenoidal surgery, one bilateral adrenalectomy), and two required a third surgery (bilateral adrenalectomy). Ten patients received radiotherapy. Sixteen women were postmenopausal, and 21 were premenopausal. Mean duration of endogenous hypercortisolism was 70 months (range, 13–241 months). Duration of hypercortisolism was considered as the period of time between symptom onset (as referred by the patients) and the diagnosis of CS plus the period of time between diagnosis and remission of hypercortisolism after treatment. CS was considered in remission if either adrenal insufficiency was demonstrated [basal morning cortisol <100 nmol/liter (<4 μ g/dl) and/or undetectable 24-h free urinary cortisol] or morning cortisol suppression

(<50 nmol/liter; <1.8 μ g/dl) after 1 mg dexamethasone overnight was observed. Information on pituitary function was collected (GH, IGF-I, TSH, free T₄, prolactin, and gonadotropins) as previously described (14). Ten patients (27%) were adrenal insufficient at the time of the dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) evaluation and required substitution therapy with glucocorticoids, whereas the other 27 had presented transient hypocortisolism after surgery but did not currently require substitution therapy. At DEXA evaluation, seven patients (19%) were GH-deficient (two of which were replaced with recombinant human GH), seven (19%) were gonadotropin-deficient (four of which were on estrogen/progesterone hormone replacement therapy, only one being postmenopausal), and five (13.5%) were hypothyroid (all on L-thyroxine replacement).

Eighty-five control women, matched for gender, age, and body mass index (BMI), were selected from the blood donors database at our hospital. For each patient, blood donors matched at the time of the study for age, gender, and date of blood donation (the same year of the diagnosis of CS) were identified. Letters were sent to selected controls, and a phone call was made 1 wk later; the first control to accept was included. Controls who reported GC treatment or malignant disease were excluded.

Methods

Total body and trunk fat mass were measured by dual-energy X-ray absorptiometry scanning (DEXA, Delphi QDR 4500; Hologic, Vilvoorde, Belgium). The mean precision error (coefficient of variation) was 1%. Anthropometric (weight, height, BMI, waist and hip circumference), sitting blood pressure (BP), and the following laboratory parameters were measured: total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-c), lipoprotein a, apolipoprotein B (ApoB), glucose, insulin, and creatinine. Levels of adiponectin, visfatin, IL-6, sTNF-R1, and sTNF-R2 were measured in plasma. BMI was calculated as weight (in kilograms)/height (meters²). The definition of the metabolic syndrome was that defined by the National Cholesterol National Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP-III) criteria (15), as modified by the American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (16).

Blood samples were collected after an overnight fast. Routine serum determinations were performed by standard automated techniques: total cholesterol and triglycerides by enzymatic methods, HDL-c by direct method, LDL-c by the Friedewald formula, and lipoprotein a and ApoB by an immunoturbidimetric method. Insulin was determined by a monoclonal immunoradiometric assay (Medgenix Diagnostics, Fleunes, Belgium). Insulin resistance was calculated using the formula of the homeostasis model assessment (HOMA): [insulin (μ U/ml) \times glucose (mmol/liter)]/22.5. Serum samples for adiponectin and visfatin were promptly separated and stored at -80 C until assayed. Adiponectin was determined by ELISA (reference, EZHADP-61K; PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) with an intraassay coefficient of variation (CV) of 3.4% and an interassay CV of 5.7%. Serum visfatin concentrations were measured by an enzyme immunoassay (Phoenix Peptides, Karlsruhe, Germany) with an intraassay CV below 5% and an interassay CV below 14%. Serum IL-6 was determined by high sensitivity ELISA (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria), with an intraassay CV of 6.9% and interassay CV of 8%. Plasma sTNF-R1 and sTNF-R2 concentrations were evaluated using solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassays (Bio-

source Europe S.A., Fleunes, Belgium), with intra- and inter-assay CVs below 8%.

Statistical analysis

Analysis was performed using SPSS 15.0 statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Quantitative data are expressed as mean and SD (Gaussian distribution) or as median and range (non-Gaussian distribution), and qualitative data are expressed as percentages. Data distribution was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons between two groups was performed using Student's *t* (Gaussian distribution) and Mann-Whitney's *U* (non-Gaussian distribution), and between three groups using ANOVA followed by Bonferroni test as a *post hoc* test or a Kruskal-Wallis *H* test, depending on the data distribution. A χ^2 test was performed for categorical variables. Bivariate correlations (Pearson) were analyzed between body fat mass, cardiovascular risk factors, and inflammation markers.

Adipokines, duration of endogenous hypercortisolism, current age, age at diagnosis of CS, BMI, waist circumference, arterial hypertension, insulin, and HOMA were considered as potential predictive factors for fat mass by a stepwise, multiple linear regression analysis.

Tests were two-tailed, and a $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Comparison between cured and active CS patients and controls

When patients were compared with BMI- and age-matched controls, cured CS patients had higher total and

trunk fat mass than controls. Adiponectin was lower in both cured and active CS patients than controls. sTNF-R1 and IL-6 were higher in both cured and active CS patients than controls. No differences were observed for visfatin and sTNF-R2 between the three groups (Table 1).

Higher levels of insulin were observed in both cured and active CS compared with controls, and a trend for higher insulin resistance was measured by HOMA. Regarding the lipid profile, only ApoB was higher in cured CS than controls. Higher systolic BP was observed in cured and active CS than controls, and higher diastolic BP in active CS than the other two groups. When the criteria of the metabolic syndrome were analyzed individually, patients with cured and active CS had more central obesity than controls (51 and 71% vs. 31%; $P < 0.01$), and more hypertension (54 and 93% vs. 29%; $P < 0.001$) than controls. Furthermore, patients with active CS had more hypertension than cured CS. No differences were observed between groups for the other components of the metabolic syndrome (data not shown). More patients with active CS fulfilled criteria for the metabolic syndrome than cured CS and controls (50 vs. 16 and 11%; $P < 0.01$).

When data were reanalyzed excluding the 10 patients who were on GC replacement therapy, the same differences were found for fat and adipokines (data not shown).

Because estrogens play an important role in body composition, cured and active CS patients and controls were divided into an estrogen-sufficient group (including pre-

TABLE 1. Comparison in women between cured and active CS patients and normal matched controls

	Cured CS	Active CS	Controls	<i>P</i>
n	37	14	85	
Total fat mass (%)	39.7 ± 7.4	39.4 ± 5.8	35.7 ± 6.9	<0.01 ^a
Trunk fat mass (%)	40.8 ± 9	40.4 ± 7.3	34.5 ± 8.8	0.001 ^a
Lean body mass (kg)	37.6 ± 6.4	39.7 ± 3.9	40.1 ± 5.3	NS
Adiponectin (ng/ml)	12.4 (5–32.4)	12.6 (8.2–26.2)	18.2 (4.5–56.5)	<0.05 ^{a,b}
Visfatin (ng/ml)	15 (8.5–24.5)	14 (9.4–36)	13.4 (7–59)	NS
sTNF-R1 (ng/ml)	1.71 (1.07–4.28)	1.61 (1.12–2.12)	1.21 (0.79–2.47)	<0.001 ^{a,b}
sTNF-R2 (ng/ml)	2.92 (1.65–11)	2.97 (1.05–7)	2.74 (1.62–5.59)	NS
IL-6 (pg/ml)	0.5 (0.07–11.09)	0.44 (0.17–6.74)	0.3 (0.07–1.48)	<0.001 ^{a,b}
Insulin (pmol/liter)	54 (14–134)	66 (14–212)	35 (14–241)	<0.05 ^{a,b}
HOMA-IR	1.61 (0.38–4.48)	2.08 (0.36–7.09)	1.09 (0.36–8.36)	NS (0.07)
Total cholesterol (mmol/liter)	5.8 ± 0.9	5.4 ± 0.7	5.4 ± 0.9	NS
HDL-c (mmol/liter)	1.6 (1.2–2.8)	1.6 (1.2–2.5)	1.7 (0.8–3.2)	NS
LDL-c (mmol/liter)	3.5 ± 0.9	3.2 ± 0.7	3.2 ± 0.8	NS
Triglycerides (mmol/liter)	1.1 (0.4–2.8)	1.0 (0.5–3.8)	0.8 (0.4–3.9)	NS
ApoB (g/liter)	1.01 ± 0.21	0.96 ± 0.16	0.89 ± 0.22	<0.05 ^a
Lipoprotein a (mg/liter)	165 (70–1144)	455 (70–900)	136 (70–1177)	NS
Systolic BP (mm Hg)	130 (100–160)	135 (100–145)	120 (90–154)	<0.05 ^{a,b}
Diastolic BP (mm Hg)	70 (60–100)	77.5 (70–100)	70 (59–94)	<0.05 ^{b,c}
BMI (kg/m ²)	25.2 (18.7–45.5)	29.6 (23.7–34)	25.4 (19–43)	NS
Current age (yr)	50 ± 14	46 ± 12	50 ± 12	NS
Menopause (%)	43	46	50	NS

Results are expressed as mean ± SD or median (range). NS, Not significant; HOMA-IR, HOMA of insulin resistance.

^a $P < 0.05$ between cured CS and controls.

^b $P < 0.05$ between active CS and controls.

^c $P < 0.05$ between cured CS and active CS.

TABLE 2. Comparison in estrogen-sufficient women between cured and active CS patients and normal matched controls: role of estrogens

	Cured CS	Active CS	Controls	P
n	20	6	43	
Total fat mass (%)	36.8 ± 7	39.6 ± 5	33.9 ± 7	NS
Trunk fat mass (%)	36.2 ± 9	39.8 ± 5	31.5 ± 8	NS
Lean body mass (kg)	38 ± 6	40.6 ± 4	40 ± 5	NS
Adiponectin (ng/ml)	11.5 (5–32)	13 (9.8–26)	17.6 (4.5–49)	NS
sTNF-R1 (ng/ml)	1.4 (1–2.7)	1.8 (1.4–2)	1.18 (0.8–2.4)	0.001 ^{a,b}
sTNF-R2 (ng/ml)	2.8 (1.6–6)	3.3 (2–7)	2.7 (2–5)	NS
IL-6 (pg/ml)	0.5 (0.1–1.8)	0.5 (0.15–0.8)	0.37 (0.17–1.4)	<0.05 ^a
Insulin (pmol/liter)	43 (14–86)	78 (28–115)	35 (14–131)	NS
HOMA-IR	1.4 (0.4–2.5)	2.5 (0.8–3.7)	1.06 (0.4–4)	NS
SBP (mm Hg)	110 (100–140)	140 (130–145)	111 (100–140)	<0.01 ^{b,c}
DBP (mm Hg)	65 (60–85)	80 (75–100)	70 (60–90)	<0.01 ^{b,c}
Current age (yr)	41 ± 10	37 ± 9	40 ± 8.5	NS

Results are expressed as mean ± sd or median (range). HOMA-IR, HOMA of insulin resistance; NS, not significant; SBP, systolic BP; DBP, diastolic BP.

^a $P < 0.05$ between cured CS and controls.

^b $P < 0.05$ between active CS and controls.

^c $P < 0.05$ between cured CS and active CS.

menopausal and postmenopausal women on hormone replacement therapy) and an estrogen-deficient group (including postmenopausal and premenopausal women with no replacement for hypogonadism). When cured and active patients and controls of the estrogen-deficient group were compared, cured CS patients had higher total and trunk fat mass, sTNF-R1, IL-6, and systolic BP than controls. Furthermore, cured CS had higher sTNF-R1 and systolic BP than active CS patients. No differences were observed in the estrogen-sufficient group regarding body composition, but sTNF-R1 and IL-6 were higher in cured CS patients than controls, and sTNF-R1 was higher in active CS than controls. Higher systolic and diastolic BP

were observed in active CS than cured CS and controls (Tables 2 and 3).

When we excluded patients with GH deficiency without replacement therapy ($n = 5$) and compared cured and active CS and controls, both CS groups had higher trunk fat mass than controls (40 ± 9 and 40.4 ± 7 vs. 34.5 ± 8 ; $P < 0.01$). Furthermore, higher levels of sTNF-R1 and IL-6 were observed in both cured and active patients compared with controls [1.6 (1–4.2) and 1.6 (1.1–2.1) vs. 1.2 (0.8–2.4); $P < 0.001$; 0.5 (0.07–1.1) and 0.4 (0.15–6.7) vs. 0.3 (0.07–1.5); $P = 0.001$, respectively] and lower levels of adiponectin in both groups of patients than controls [12.4 (5–32) and 12.6 (8.2–26) vs. 18.2 (4.5–56.5); $P < 0.05$].

TABLE 3. Comparison in estrogen-deficient women between cured and active CS patients and normal matched controls: role of estrogens

	Cured CS	Active CS	Controls	P
n	17	8	42	
Total fat mass (%)	43 ± 6	39.2 ± 7	37.5 ± 7	<0.05 ^a
Trunk fat mass (%)	46 ± 6	40.8 ± 9	37.4 ± 8	0.001 ^a
Lean body mass (kg)	37 ± 7	39 ± 4	40 ± 5	NS
Adiponectin (ng/ml)	16 (7–31)	13 (8–19)	19 (5–56)	NS
sTNF-R1 (ng/ml)	2 (1.2–4.2)	1.5 (1–2)	1.2 (0.8–2.2)	<0.01 ^{a,b}
sTNF-R2 (ng/ml)	3.5 (2–11)	3 (1–3)	3 (2–5)	NS
IL-6 (pg/ml)	0.5 (0.07–1.1)	0.38 (0.2–6.7)	0.29 (0.07–1.2)	<0.05 ^a
Insulin (pmol/liter)	68 (14–134)	58 (14–212)	34 (14–241)	NS
HOMA-IR	2.2 (0.4–4)	1.8 (0.3–7)	1.1 (0.3–8)	NS
SBP (mm Hg)	140 (110–160)	130 (100–135)	130 (90–154)	<0.01 ^{a,b}
DBP (mm Hg)	75 (60–100)	72.5 (70–75)	70 (59–94)	NS
Current age (yr)	60 ± 10	53 ± 10	60 ± 7.4	NS

Results are expressed as mean ± sd or median (range). HOMA-IR, HOMA of insulin resistance; NS, not significant; SBP, systolic BP; DBP, diastolic BP.

^a $P < 0.05$ between cured CS and controls.

^b $P < 0.05$ between cured CS and active CS.

When we compared cured patients with pituitary ($n = 27$) and adrenal ($n = 10$) origin of CS, no differences were observed in fat mass, BP, current age, dose, duration of GC exposure, or percentage of patients with adrenal deficiency. Of adipokines, only IL-6 was higher in pituitary than in adrenal patients [0.6 (0.26 – 1.1) *vs.* 0.33 (0.07 – 1.5); $P < 0.05$].

Correlations between fat mass, cardiovascular risk factors, and inflammatory markers

In patients with cured CS, percentage of trunk fat mass correlated with sTNF-R1 ($r = 0.559$; $P = 0.001$), BMI ($r = 0.783$; $P < 0.001$), waist circumference ($r = 0.795$; $P < 0.001$), insulin ($r = 0.358$; $P < 0.05$), HOMA index ($r = 0.384$; $P < 0.05$), current age ($r = 0.542$; $P = 0.001$), and systolic ($r = 0.427$; $P < 0.01$) and diastolic BP ($r = 0.502$; $P < 0.01$). After a stepwise, multiple linear regression analysis, only waist circumference (β , 0.689 ; $P < 0.001$) and sTNF-R1 (β , 0.314 ; $P < 0.05$) persisted significantly related to trunk fat mass (R^2 of the model, 0.721). In healthy controls, sTNF-R1 correlated with trunk fat mass ($r = 0.373$; $P < 0.05$), but after adjustment for anthropometric parameters, this correlation lost statistical significance.

Discussion

Although abnormal body composition is characteristic of active CS (increased total fat mass and trunk fat mass and low lean body mass, little is known about body composition after long-term recovery of CS. Changes in secretion of adipokines have been reported in obesity (6), as increased TNF α and IL-6, among others, and reduced adiponectin levels. However, there are no data on adipokine levels in CS after long-term cure. A recent report studied adipokines in a small number of patients with active CS; only resistin levels were higher in female patients compared with controls, but no differences in adiponectin were found. Subsequently, a subgroup of these patients were reevaluated 9 months after curative surgery, when no statistical differences were observed between baseline and postsurgery adiponectin and resistin levels (17). Another study showed lower adiponectin levels in nonobese patients with active CS compared with nonobese controls (18). An increase in proinflammatory cytokines IL-8 and IL-18 has been described in another study performed in patients with active CS (19). To our knowledge, this is the first report to demonstrate persistent abnormal body composition and persistently impaired secretion of adipokines after long-term remission for a mean of 11 yr of adult-onset CS.

Persistence of increased total and central body fat has been reported in patients with cured CS whose disease began in childhood or adolescence (20, 21). In our study, only one patient presented with symptoms at the age of 9 yr, whereas all the others were diagnosed in adulthood. This increase in trunk fat is a common complaint of patients who have suffered from CS and also those who have been treated with high doses of exogenous GC. Given the increased cardiovascular risk conferred by central obesity, this persistence in trunk fat may contribute to long-term morbidity in these patients, despite endocrine control (22). When considering the role of estrogens, women with cured CS in the estrogen-deficient group had more total and trunk fat mass than healthy controls; however, these differences were not observed in the estrogen-sufficient group. Thus, postmenopausal women who have lost the protective effects of estrogens on the cardiovascular system and have more total and trunk fat related to their prior CS, would be at an even higher cardiovascular risk. The fact that abnormal body composition was observed only in estrogen-deficient women could influence the data in the combined group (estrogen-deficient and sufficient). Thus, the absence of estrogens in these patients who have suffered CS appears to play a major role in persistent fat accumulation. A possible explanation for the persistent increase in trunk fat may be the effect of cortisol on the omental adipose tissue, due to the hyperactivation of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (which converts inactive cortisone to active cortisol), stimulating the differentiation of more preadipocytes to adipocytes; thus, after hypercortisolism has disappeared, the increased number of fat cells remains and can contribute to explaining the persistent increase in abdominal fat deposits (23–25). A dysregulation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis could also be involved; there is evidence that a hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, as a result of a chronic reaction to stress, may lead to visceral distribution of body fat and other metabolic syndrome manifestations (26, 27). Another novel mechanism that explains the deposition of visceral adipose tissue and the consequent central obesity in patients with iatrogenic or endogenous CS is the inhibition of AMP-activated protein kinase activity in adipose tissue by glucocorticoids (28). This inhibition leads to increased lipid stores and enhanced lipolysis, leading to the release of free fatty acids. These mechanisms might lead to irreversible abdominal fat in patients with CS even after long-term cure, with the consequent unfavorable profile of adipocytokines (in our cured patients, a persistence of increased levels of sTNF-R1 and IL-6 and reduced levels of adiponectin). This “inflammatory state” may determine vascular damage and, thus, atherosclerosis and cardiovascular disease. In

our cured patients, sTNF-R1 was the adipokine that correlated positively with central fat mass and remained significant after adjustment for anthropometric parameters. Thus, plasma levels of sTNF-R1 could be a link between central fat mass and persistence of high cardiovascular risk in patients with long-term cured CS.

A potential limitation of this study is the small sample size, with 27 pituitary and 10 adrenal CS patients. However, larger series of cured CS and patients followed long term are difficult to obtain because it is a rare disease and remission of hypercortisolism is frequently difficult to attain, mainly in pituitary disease. CS is more frequent in women than in men (with a ratio of 15:1) (29); we decided to exclude men from the study given the small number of patients (n = 10) and, furthermore, to avoid confounding factors related to sex hormones.

Despite long-term remission of hypercortisolism, CS must be considered as a state of low-grade inflammation because central fat mass and consequent increased levels of adipokines persisted after cure of CS, leading to a situation of increased cardiovascular risk in these patients. Weight loss has been reported to improve the impaired secretion of adipokines in obese patients (30, 31). However, in our CS patients, despite long-term cure, increased central fat mass and abnormal adipokines persisted, as in the active patients. New therapeutic approaches should be considered in these patients; for example, recent data show metformin as a potential treatment to prevent or treat the accumulation of visceral adipose tissue in patients with endogenous or iatrogenic CS (28) because metformin reverses the inhibitory effects of GC on AMP-activated protein kinase.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: María-José Barahona, Department of Endocrinology, Hospital Mútua de Terrassa, Pl Dr Robert 5, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain. E-mail: 33962mbc@comb.cat.

This work was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria 05/0448). M.-J.B. was supported by a fellowship from Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (2003 FI 00102).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Burt MG, Gibney J, Ho KK 2006 Characterization of the metabolic phenotypes of Cushing's syndrome and growth hormone deficiency: a study of body composition and energy metabolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:436–443
- Shaker JL, Lukert BP 2005 Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:341–356, viii–ix
- Ueland T, Kristo C, Godang K, Aukrust P, Bollerslev J 2003 Interleukin-1 receptor antagonist is associated with fat distribution in endogenous Cushing's syndrome: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1492–1496
- Pirlich M, Biering H, Gerl H, Ventz M, Schmidt B, Ertl S, Lochs H 2002 Loss of body cell mass in Cushing's syndrome: effect of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1078–1084
- Colao A, Pivonello R, Spiezia S, Faggiano A, Ferone D, Filippella M, Marzullo P, Cerbone G, Siciliani M, Lombardi G 1999 Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2664–2672
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:355–365
- Trujillo ME, Scherer PE 2006 Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27:762–778
- Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, Richart C 1998 Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* 47:1757–1762
- Santaniemi M, Kesäniemi YA, Ukkola O 2006 Low plasma adiponectin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 155:745–150
- Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y; Osaka CAD Study Group 2003 Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:85–89
- Frydyst J, Berne C, Berglund L, Jensen K, Flyvbjerg A, Zethelius B 2007 Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 92:571–576
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M 2003 Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 108:2317–2322
- Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, Curhan GC, Rifai N, Cannuscio CC, Stampfer MJ, Rimm EB 2004 Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med* 351:2599–2610
- Webb SM, Rigla M, Wägner A, Oliver B, Bartumeus F 1999 Recovery of hypopituitarism after neurosurgical treatment of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3696–3700
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel 2002 Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), final report. *Circulation* 106:3143–3421
- Grundy SM, Cleeman JL, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith Jr SC, Spertus JA, Costa F 2005 Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735–2752
- Krsek M, Silha JV, Jezková J, Hána V, Marek J, Weiss V, Stepán JJ, Murphy LJ 2004 Adipokine levels in Cushing's syndrome; elevated resistin levels in female patients with Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:350–357
- Fallo F, Scarda A, Sonino N, Paoletta A, Boscaro M, Pagano C, Federspil G, Vettor R 2004 Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 150:339–344
- Kristo C, Godang K, Ueland T, Lien E, Aukrust P, Froland SS, Bollerslev J 2002 Raised serum levels of interleukin-8 and interleukin-18 in relation to bone metabolism in endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 146:389–395
- Abad V, Chrousos GP, Reynolds JC, Nieman LK, Hill SC, Weinstein RS, Leong GM 2001 Glucocorticoid excess during adolescence leads

- to a major persistent deficit in bone mass and an increase in central body fat. *J Bone Miner Res* 16:1879–1885
21. **Leong GM, Abad V, Charmandari E, Reynolds JC, Hill S, Chrousos GP, Nieman LK** 2007 The effects of child-and adolescent-onset endogenous Cushing syndrome on bone mass, body composition and growth: a 7-year prospective study into young adulthood. *J Bone Miner Res* 22:110–118
 22. **Pivonello R, Faggiano A, Lombardi G, Colao A** 2005 The metabolic syndrome and cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:327–339, viii
 23. **Stewart PM** 2003 Tissue-specific Cushing's syndrome, 11β -hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action. *Eur J Endocrinol* 149:163–168
 24. **Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM** 2004 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25:831–866
 25. **Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM** 1997 Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 349:1210–1213
 26. **Chrousos GP** 2000 The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrin and target tissue-related causes. *Int J Obes* 24(Suppl 2): S50–S55
 27. **Rosmond R, Björntorp P** 2000 Occupational status, cortisol secretory pattern and visceral obesity in middle-aged men. *Obes Res* 8:445–450
 28. **Kola B, Christ-Crain M, Lolli F, Arnaldi G, Giacchetti G, Boscaro M, Grossman AB, Korbonits M** 2008 Changes in AMP-activated protein kinase as a mechanism of visceral obesity in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4969–4973
 29. **Etxabe J, Vazquez JA** 1994 Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 479–484
 30. **Manco M, Fernandez-Real JM, Equitani F, Vendrell J, Valera Mora ME, Nanni G, Tondolo V, Calvani M, Ricart W, Castagneto M, Mingrone G** 2007 Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 92:483–490
 31. **Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D** 2002 Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 105:804–809

Deleterious Effects of Glucocorticoid Replacement on Bone in Women After Long-Term Remission of Cushing's Syndrome

Maria-José Barahona,¹ Nuria Sucunza,¹ Eugenia Resmini,¹ Jose-Manuel Fernández-Real,² Wifredo Ricart,² Jose-Maria Moreno-Navarrete,² Teresa Puig,³ Ana M. Wägner,¹ José Rodríguez-Espinosa,¹ Jordi Farrerons,⁴ and Susan M. Webb¹

ABSTRACT: Endogenous hypercortisolism and high-dose and long-term glucocorticoid (GC) therapy reduce bone mass. Patients in remission after successful treatment of Cushing's syndrome (CS) often present hypoadrenalism and require long-term GC replacement. The aim of our study was to evaluate whether this GC "replacement" had any further effect on bone in women after long-term remission of CS. Thirty-seven women (mean age: 50 ± 14 yr; 27 of pituitary and 10 of adrenal origin) with cured CS (mean time of cure: 11 ± 6 yr), 14 with active CS, and 85 sex-, body mass index (BMI)-, and age-matched controls were enrolled. BMD and BMC were measured by DXA scanning. Bone biochemical markers were also measured. Duration and dose of GC replacement and duration of endogenous hypercortisolism were calculated. Cured and active CS patients had less BMC, BMD, and osteocalcin than controls ($p < 0.01$). These differences were observed in estrogen-sufficient women but not in those with estrogen deficiency. Duration of GC treatment (mean: 42 mo; range, 2–420 mo) and endogenous hypercortisolism (mean: 70 mo; range, 13–241 mo) negatively correlated with BMC and lumbar spine BMD. After regression analysis, the main predictor of abnormal BMC and BMD was the duration of GC replacement ($p < 0.01$). Patients treated for CS persistently have less bone mass despite long-term cure. Both duration of endogenous hypercortisolism and mainly exogenous "replacement" therapy with GC negatively affect bone mass. Thus, the additional deleterious effect of GC for the treatment of adrenal axis suppression should be considered.

J Bone Miner Res 2009;24:1841–1846. Published online on May 4, 2009; doi: 10.1359/JBMR.090505

Key words: Cushing's syndrome, glucocorticoid replacement, BMD, bone mass, osteocalcin

Address correspondence to: *Maria-José Barahona, MD, Department of Endocrinology, Hospital Mútua de Terrassa, Pl Dr Robert 5, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain, E-mail: 33962mbc@comb.cat*

INTRODUCTION

CUSHING'S SYNDROME (CS) can be caused by exogenous glucocorticoid (GC) therapy or by endogenous hypersecretion of cortisol, most frequently because of a pituitary adrenocorticotropic hormone (ACTH)-producing adenoma (Cushing's disease [CD]) or an adrenal tumor. Any chronic GC excess exerts important changes in body composition and reduces bone mass.^(1–4) This bone loss is caused by the direct and indirect effects of GC on bone, such as reduction of osteoblastic and increase of osteoclastic activity, induction of hypogonadism, reduction of intestinal calcium absorption, and increase of urinary calcium excretion. Some studies report a complete recovery of bone mass after cure of CS^(5–7); however, others show incomplete recovery,^(8–10) and it is not fully elucidated the time required for total bone mass recovery. There is a growing interest over the last years on the effect of long-term GC replacement on bone in endocrinological diseases, such as 21-hydroxylase deficiency or primary adrenal insufficiency.^(11–13)

Optimization of GC substitution therapy is difficult, because oral administration of the different available drugs often does not simulate the endogenous circadian rhythm; furthermore, oral therapy is difficult to monitor.^(14,15)

CS patients become eucortisolemic or hypocortisolemic after successful treatment and often require replacement therapy for a variable period of time; whether this exposure has any further effect on bone mass is unknown. The aim of this study was to investigate how GC exposure, both endogenous hypercortisolism during active CS and during substitution therapy for adrenal insufficiency after successful treatment, affects bone in women in long-term remission of CS.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

In this case-control study, patients in remission of CS followed in our institution since 1982 were eligible. Patients with carcinoma or ectopic ACTH-producing tumors were excluded. A total of 96 CS patients were identified; of

The authors state that they have no conflicts of interest.

¹Endocrinology and Medicine Departments and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER, Unidad 747), ISCIII, Hospital Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Endocrinology Department, Institut d'Investigació Biomèdica de Girona (IDIBGI) and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición CB06/03/010, Hospital Josep Trueta, Girona, Spain; ³Epidemiology Department, Hospital Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁴Internal Medicine Department, Hospital Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

these, 5 had died and 30 were lost to follow-up (including patients from other regions of Spain who after successful operation were in remission of hypercortisolism and followed by their previous physicians); of the remaining patients, 10 were men and were excluded. At the time of the study, 14 women were hypercortisolemic (4 of which had recurred; 13 of pituitary and 1 of adrenal origin) and 37 were in remission (27 of pituitary and 10 of adrenal origin) and were included in this study. All patients signed an informed consent after study approval by the hospital ethics committee. In cured CS, mean age at the time of study was 50 ± 14 yr, whereas mean age at the time of CS diagnosis was 36 ± 12 yr; mean time of hormonal cure of hypercortisolism was 11 ± 6 yr. Only one patient developed symptoms at the age of 9 yr, whereas the others started in adulthood. Unilateral adrenalectomy was performed in the patients with adrenal adenomas, except in one that required bilateral adrenalectomy. Twenty-six patients of pituitary origin underwent transsphenoidal surgery (TSS), and one underwent initial bilateral adrenalectomy. Seven patients required a second surgery (six TSS and one bilateral adrenalectomy) and two required a third surgery (bilateral adrenalectomy). Ten patients received radiotherapy. Sixteen women were postmenopausal and 21 were premenopausal. Mean duration of endogenous hypercortisolism was 70 mo (range, 13–241 mo), and mean duration of GC treatment was 42 mo (range, 2–420 mo). Oral hydrocortisone was the drug used twice or three times daily as replacement therapy in all cases when required. Median GC dose was 20 mg/d. Duration of hypercortisolism was considered as the period of time between symptom onset (as referred by the patients) and the diagnosis of CS (mean duration of this period was 48 mo) plus the period of time between diagnosis and remission of hypercortisolism after treatment. Duration of GC treatment was defined as the period of time in months that patients required GC replacement; in those currently on GC treatment, duration was calculated since the beginning of replacement until the date that DXA was performed. Daily GC dose was expressed as dose per body surface per day ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$). Body surface area (BSA) was calculated by the Mosteller formula.⁽¹⁶⁾ Mean GC dose was 11 ± 4 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$. CS was considered in remission if either adrenal insufficiency was shown (basal a.m. cortisol < 100 nM [< 4 $\mu\text{g}/\text{dl}$] and/or undetectable 24-h free urinary cortisol) or morning cortisol suppression (< 50 nM, < 1.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$) after 1 mg dexamethasone overnight was observed.

Information on pituitary function was collected (growth hormone [GH], IGF-I, thyroid-stimulating hormone (TSH), free thyroxine (T4), prolactin, and gonadotrophins) as previously described.⁽¹⁷⁾ Of the cured patients, 10 (27%) were adrenal insufficient at the time of the DXA evaluation and required substitution therapy with GC, whereas the other 27 presented transient hypercortisolism after surgery but did not currently require substitution therapy. At the time of DXA evaluation, seven patients (19%) were GH deficient (two of which were replaced with recombinant human GH), seven (19%) were gonadotropin deficient (four of which were on estrogen/progesterone hormone replacement therapy, only one postmenopausal), and five (13.5%) were hypothyroid (all on L-thyroxine replacement). Five cured CS

patients were on calcium and vitamin D therapy; of these patients, two were also treated with bisphosphonates and one with raloxifene. Three active patients were on calcium and vitamin D therapy; one of them was also treated with bisphosphonates. At the time of the DXA evaluation, six active patients were treated with metyrapone, four with ketoconazole, and one with both drugs. Information on fractures was collected before or at diagnosis of CS and during follow-up. Multiple fractures observed at the same time (e.g., various vertebral fractures) counted as one fracture episode. In women with cured CS, eight fractures were found 1–2 yr before or at diagnosis of CS (four hip, one vertebral—various affected dorsal vertebrae, and three single rib fractures). During follow-up, five fractures were found: one hip, three single rib fractures, and one tibia and fibula traumatic fracture. Furthermore, an episode of avascular necrosis of the proximal femur was observed at follow-up in one patient. In women with active CS, three fractures were found 1 yr before or at diagnosis of CS (one hip, one vertebral—two affected lumbar vertebrae, and one rib fracture—with multiple affected ribs). During follow-up, two metatarsal fractures were observed.

Eighty-five control women, matched for age and body mass index (BMI), were selected from the blood donors database at our hospital. For each patient, blood donors matched for age, sex, and date of blood donation (the same year of the diagnosis of CS) were identified. Letters were sent to selected controls, and a phone call was made 1 wk later; the first control to accept was included. Controls who referred GC treatment or malignant disease were excluded. Two controls were on calcium and vitamin D therapy: one combined with bisphosphonates.

Methods

Lumbar spine and whole body BMD and whole body BMC were measured by DXA scanning (Delphi QDR 4500; Hologic). The mean precision error (CV) was 1%. Anthropometric parameters were measured (height, weight, and BMI). BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m^2). Bone biochemical markers were measured: osteocalcin and total amino-terminal propeptide of type 1 procollagen (total P1NP) as bone formation markers and carboxy-terminal telopeptide (β -Crosslaps) as a bone resorption marker. Osteocalcin was measured by enzyme-labeled chemiluminescent immunometric assay (Immulite 2000; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Llanberis, UK); within-run precision for mean concentrations between 4.0 and 47.3 ng/ml was 4.8–3.2%. β -Crosslaps and total P1NP were measured by electrochemiluminescent immunoassay (Elecsys Modular Analytics E170; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Within-run precision for mean concentrations of β -Crosslaps between 0.08 and 3.19 ng/ml was 4.6–1.0%, and within-run precision for mean concentrations of total P1NP between 29.1 and 1027 ng/ml was 2.9–1.1%.

Statistical analysis

Analysis was performed using the SPSS 15.0 statistical package for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Quantitative data are expressed as mean and SD (Gaussian distribution) or as median and range (non-Gaussian distribution), and

TABLE 1. Comparison Between Cured and Active CS Patients and Normal Matched Controls

	Cured CS	Active CS	Controls	<i>p</i>
<i>N</i>	37	14	85	
Whole BMC (kg)	1.88 ± 0.31	1.79 ± 0.20	2.05 ± 0.29	0.001*
Whole BMD (g/cm ²)	1.05 ± 0.09	1.02 ± 0.06	1.11 ± 0.09	0.001*
Lumbar BMD (g/cm ²)	1.05 ± 0.18	0.92 ± 0.10	1.11 ± 0.20	<0.01 [†]
Osteocalcin (ng/ml)	2 (2–10.6)	2 (2–15.4)	4.07 (2–14.7)	<0.01*
β-Crosslaps (ng/ml)	0.26 (0.02–0.58)	0.28 (0.03–1.05)	0.27 (0.09–1.02)	NS
Total PINP (ng/ml)	39.8 (6.34–111)	32.7 (13.7–114)	42.4 (12.5–192)	NS
BMI (kg/m ²)	25.2 (18.7–45.5)	29.6 (23.7–34)	25.4 (19–43)	NS
Current age (yr)	50 ± 14	46 ± 12	50 ± 12	NS
Menopausal (%)	43	46	50	NS

Results are expressed as mean ± SD or median and range.

* *p* between controls and the other two groups.

[†] *p* between controls and active CS.

NS, not significant; BMI, body mass index.

TABLE 2. Comparison Between Cured and Active CS Patients and Normal Matched Controls: Role of Estrogens

	Cured CS		Active CS		Controls		<i>p</i> *	<i>p</i> [†]
	Estrog+	Estrog–	Estrog+	Estrog–	Estrog+	Estrog–		
<i>N</i>	20	17	6	8	43	42		
BMC (kg)	1.96 ± 0.22	1.79 ± 0.38	1.83 ± 0.26	1.76 ± 0.15	2.15 ± 0.29	1.94 ± 0.24	<0.01 [‡]	NS
Whole BMD (g/cm ²)	1.07 ± 0.06	1.03 ± 0.11	1.05 ± 0.08	1.01 ± 0.05	1.14 ± 0.08	1.07 ± 0.09	<0.01 [‡]	NS
Lumbar BMD (g/cm ²)	1.06 ± 0.17	1.05 ± 0.2	0.96 ± 0.08	0.89 ± 0.1	1.17 ± 0.17	1.04 ± 0.2	<0.01 [‡]	NS

* Differences between the estrogen-sufficient groups of cured and active patients and controls.

[†] Differences between the estrogen-deficient groups of cured and active patients and controls.

[‡] *p* < 0.01 between controls and the other two groups.

Estrog⁺, estrogen sufficient; Estrog[–], estrogen deficient.

qualitative data are expressed as percentages. Data distribution was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons between two groups were performed using Student's *t*-test (Gaussian distribution) and Mann-Whitney's *U*-test (non-Gaussian distribution). Comparisons between three groups were performed using ANOVA followed by Bonferroni test as a posthoc test or a Kruskal-Wallis *H* test, depending on the data distribution. A χ^2 test was performed for categorical variables. Bivariate correlations (Pearson) were analyzed between bone mass and duration of GC treatment, GC dose, and duration of endogenous hypercortisolism.

Duration of GC treatment, daily GC dose, duration of endogenous hypercortisolism, current age, age at CS diagnosis, BMI, menopause, and other hormone deficiencies were considered as potential predictive factors for BMC and BMD by a stepwise, multiple linear regression analysis.

Tests were two-tailed, and a *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Comparison between cured and active CS patients and controls

When patients were compared with BMI and age-matched controls, both cured and active had less whole body BMD and BMC. Lumbar spine BMD was lower in active CS than controls. Osteocalcin was lower in both

cured and active CS patients than controls. No differences were observed for postmenopausal status, β-Crosslaps, and total PINP in the three groups (Table 1).

Because estrogens play an important role on bone, cured and active CS patients and controls were divided into an estrogen-sufficient group (including premenopausal and postmenopausal women with hormone replacement therapy) and an estrogen-deficient group (including postmenopausal and premenopausal women with no replacement for hypogonadism). When cured and active patients and controls of the estrogen-sufficient group were compared, both cured and active CS patients had less whole body BMD and BMC and less lumbar spine BMD than controls (Table 2). No differences were observed between estrogen-deficient patients and controls.

When we excluded patients with GH deficiency without replacement therapy (*N* = 5) and compared cured and active CS and controls, both CS groups had less BMC and whole body BMD than controls (1.89 ± 0.31 and 1.79 ± 0.2 versus 2.05 ± 0.3, *p* < 0.01 and 1.05 ± 0.09 and 1.02 ± 0.06 versus 1.11 ± 0.09, *p* < 0.01, respectively). Furthermore, patients with active hypercortisolism had less lumbar spine BMD than cured CS and controls (0.92 ± 0.1 versus 1.07 ± 0.18 and 1.11 ± 0.2, *p* < 0.01).

Correlations between bone parameters and GC exposure (exogenous and endogenous) in cured CS

Both duration of GC treatment and duration of endogenous hypercortisolism negatively correlated with whole

TABLE 3. Stepwise, Multiple Linear Regression Analysis to Identify Predictors of Abnormal Bone Mass

Dependent variable	Predictors	B	p	Constant	R ²
BMC	Duration of GC treatment	-0.002	<0.01	1.82	0.57
	Age at CS diagnosis	-0.010	<0.05		
	BMI	0.017	<0.05		
L-BMD	Duration of GC treatment	-0.001	0.001	1.12	0.27

Duration of GC treatment is expressed in months.

GC, glucocorticoids; BMI, body mass index; B, unstandardized coefficient.

body BMC ($r = -0.587$, $p < 0.001$ and $r = -0.352$, $p < 0.05$, respectively) and lumbar spine BMD ($r = -0.509$, $p = 0.001$ and $r = -0.419$, $p < 0.05$, respectively). Daily GC dose did not correlate with any of the bone parameters. No correlation was found between duration of either GC treatment or endogenous hypercortisolism and whole body BMD and bone turnover markers (data not shown). After a stepwise, multiple linear regression analysis, duration of GC treatment and age at CS diagnosis were negatively and BMI was positively related to BMC; only duration of GC treatment significantly predicted lumbar spine BMD (Table 3).

Osteocalcin and Cross-laps were significantly correlated in cured CS patients ($r = 0.372$, $p < 0.05$) and controls ($r = 0.454$, $p < 0.001$) but not in the active CS group ($r = 0.150$, $p = 0.61$).

Regarding the duration of GC replacement therapy, patients were divided by tertiles into three groups: <7 mo of therapy ($N = 12$), between 7 and 26 mo of therapy ($N = 14$), and >26 mo of therapy ($N = 11$). Those with longer duration of treatment had less whole body BMC than the other two groups (1.65 ± 0.3 versus 2.03 ± 0.2 and 1.94 ± 0.3 , $p < 0.01$) and less whole body BMD than those treated for <7 mo (0.99 ± 0.1 versus 1.10 ± 0.06 , $p < 0.01$). No statistical differences between groups were found in lumbar spine BMD, BMI, current age, menopausal status, pituitary hormone deficiencies, GC dose, and duration of endogenous hypercortisolism (data not shown). Those with longer duration of GC replacement required a second and a third surgery more frequently than the other two groups (45% versus 8% and 7%; 18% versus 0%); however, these patients did not require radiotherapy more frequently than those treated for <7 mo (36% versus 42%).

No differences were observed when cured patients with pituitary-dependent CD ($N = 27$) were compared with those with an adrenal cause of CS ($N = 10$) as far as bone parameters or dose and duration of GC exposure was concerned (data not shown). Pituitary-dependent CD patients had longer duration of endogenous hypercortisolism than those with an adrenal cause of CS (66.5 [15.1–241] versus 27.6 mo [13.3–89]; $p < 0.01$).

DISCUSSION

In this case-control study, we showed that duration of both exogenous GC replacement therapy and endogenous

hypercortisolism negatively affect BMC and BMD in women in long-term remission after successful therapy for CS compared with matched controls. To our knowledge, this is the first report to study the effect of hypercortisolism on bone in women, a mean of 11 yr after successful treatment of CS. After adjusting for confounding variables, among others duration of active endogenous hypercortisolism, gonadal status, and pituitary hormone deficiencies, duration of GC treatment emerged as the strongest predictor for low bone mass, which questions the concept that this is truly a “replacement” dose. Even though the duration of endogenous hypercortisolism relies on the patient’s recollections on symptoms onset and duration before the diagnosis of CS was made, and may explain the weaker correlation in the regression analysis, there is no other way to define the initiation of the disease. One might have expected that duration of endogenous hypercortisolism (mean of 6 yr) would be a better predictor of bone mass than duration of GC replacement (mean of 3.5 yr). However, it is worth remembering that when CS was diagnosed, patients were treated with cortisol-lowering drugs, such as metyrapone and/or ketoconazole, until surgery was performed. Despite hypercortisolism being improved with these drugs, no cure of CS was considered until surgery was performed, and criteria of cure were attained. Thus, duration of hypercortisolism prediagnosis (mean of 4 yr) seems to be more harmful to bone than after diagnosis, and it is of similar duration as postoperative GC replacement (3.5 yr). However, after regression analysis including duration of hypercortisolism prediagnosis, duration of GC replacement remained as the main predictor for low BMC; the damage done to bone during endogenous hypercortisolism may still have determined a worse response to subsequent GC replacement. We found no correlation with daily GC dose, which contrasts with a study that showed a relationship between fracture risk and daily GC dose in a cohort of oral GC users⁽¹⁸⁾; this may be explained by the fact that the replacement dose of GC in adrenal insufficient patients after successful therapy for CS is a standard, lower dose; ~20 mg hydrocortisone/d.

Whereas the increased risk of fractures and bone loss in active CS is well known,⁽¹⁹⁾ little has been reported in patients cured from hypercortisolism. A recent study showed normalization of BMD in multiple skeletal compartments of patients with endogenous CS after a prolonged recovery time (mean of 6 yr).⁽⁵⁾ Another study reported complete BMD recovery a mean of 9 yr after cure of CS.⁽⁶⁾ A further report showed an increased fracture risk in patients with CS in the 2 yr immediately before diagnosis but not after diagnosis and treatment.⁽⁷⁾ However, ours is the longest study, and we reported persistence of low BMC and BMD, despite 11 ± 6 yr of remission of CS. Several reasons may explain these discordant results; first, we only included women, whereas the other studies included both sexes; second, mean duration of endogenous hypercortisolism was 6 yr in our patients compared with 3 yr in the report by Manning and not reported by Kristo; finally, the duration of GC therapy, one of the main predictors for long-term bone mass abnormalities in our patients, was not mentioned in the other two studies. Previous studies have

described incomplete restoration of bone mass after treatment for CS after shorter follow-ups of 2⁽⁸⁾ and 3 yr.⁽⁹⁾ Another report, using spine X-rays, showed an increased prevalence of spine damage in patients cured of CS for a mean of 4 yr.⁽¹⁰⁾ Although some reports have found more severe bone loss in primary adrenal than in pituitary-dependent CS,^(20,21) our study and other recent reports have not found differences in bone loss between adrenal and pituitary-dependent CS.⁽¹⁹⁾

Conflicting data have also been reported in other causes of adrenal insufficiency. In 15 patients with primary or secondary (caused by a pituitary tumor) adrenal insufficiency, treated with GC replacement for >5 yr (mean duration: 12 ± 6.5 yr), no differences in BMD were found compared with controls, and no correlation was found with duration or dose of GC replacement⁽¹¹⁾; they concluded that regular monitoring of BMD measurements was not required, because patients with adrenal insufficiency receiving recommended replacement doses (15–20 mg daily of hydrocortisone) were not at an increased risk of osteoporosis. In our study, patients received a median of 20 mg daily of hydrocortisone and did present lower BMC and BMD values than controls; one could argue that prior endogenous hypercortisolism could have determined this bone loss, but the strongest determinant was duration of GC treatment. Additionally, in patients with 21-hydroxylase deficiency who required long-term GC replacement therapy, lower BMD compared with healthy controls was found, with no correlation with current GC dose.^(12,13)

The main cause of bone loss in the general population is estrogen deficiency, as seen in the postmenopausal state. In some studies, CS has been shown to cause more severe bone damage in postmenopausal than premenopausal women.⁽²²⁾ However, our study and others^(19,23) suggest that the protective effect of estrogens on bone mass is lost in CS, because BMC and BMD in our patients in the estrogen-sufficient group were lower than in the respective controls; however, these differences were not observed in the estrogen-deficient group. Our finding supports that this bone loss in the estrogen-sufficient group is caused by the negative effects of the GC excess on bone. To avoid variables that would be expected to affect bone mass, we excluded from the analysis those patients with unreplaced GH deficiency. One could argue that patients who are GH deficient (and therefore have additional pituitary insufficiency) would be those mostly likely to require longer GC replacement. However, BMD and BMC were persistently lower in cured and active CS patients compared with controls. One might have expected that patients who needed longer GC replacement would be those with different characteristics (severity of disease or treatment). They required a second and a third surgery more frequently than those with shorter GC replacement, which could suggest a more "resistant" disease. However, another explanation could be the improvement in surgical outcome, because the same two neurosurgeons undertook all pituitary surgery in our hospital since 1982. As we previously described,⁽²⁴⁾ one of the main predictors of neurosurgical outcome in pituitary adenomas was operation date (OR = 0.40 for neurosurgery performed up to

1991), suggesting that neurosurgical experience plays an important role. Most patients of the group of longer duration of GC replacement had surgery before 1992 (62.5%) compared with those with shorter GC replacement (25%); therefore, less neurosurgical experience could explain that patients with longer GC replacement required a second and third surgery more frequently until cure. However, these patients did not require radiotherapy more frequently than those treated for <7 mo.

Depressed levels of osteocalcin have been reported during long-term corticosteroid therapy, as well as during the active phase of CS.⁽²⁵⁾ After successful treatment of CS, an increase in osteocalcin levels has been reported.^(5,26) However, in our study, cured CS patients still had lower osteocalcin levels than controls, suggesting that the persistent reduction in osteoblastic activity may be one of the mechanisms related to the absence of recovery of BMD. A possible explanation may be the hyperactivation of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1; which converts inactive cortisone to active cortisol) within osteoblasts.⁽²⁷⁾ Recent studies have shown that the activity of osteoblastic 11 β -HSD1 increases with age and GC exposure.⁽²⁸⁾ Discordant data have been reported on other less specific bone formation markers such as P1NP and resorption markers such as Cross-laps. Levels of both markers were found to be reduced⁽²⁴⁾ or normal,^(9,29) as in our study. Recent studies have shown a lack of correlation between bone formation and resorption markers in active CS patients,⁽³⁰⁾ which is restored after successful treatment of CS,⁽⁵⁾ indicating restoration of the bone remodeling process. In our study, although no correlation was found between osteocalcin and Cross-laps in active CS, there was a correlation in cured CS and controls. Despite the restoration of bone turnover in our cured CS, bone mass did not revert to normal 11 yr after cured of CS. Therefore, treatment with bisphosphonates might be useful in this group of patients; it has been reported that treatment with alendronate in cured CS may induce a more rapid improvement in bone mass than cortisol normalization alone.⁽³¹⁾

A potential limitation of this study is the small sample size, with 27 pituitary and 10 adrenal CS patients. However, larger series of cured CS that were followed long term are difficult to obtain because it is a rare disease and frequently remission of hypercortisolism is difficult to attain, mainly in pituitary disease.

We conclude that, in CS, even after long-term remission of endogenous hypercortisolism, a reduction of bone mass persists, mainly in estrogen-sufficient women, which may confer an increased fracture risk. Furthermore, the longer duration of so called "replacement" GC substitution treatment is related to lower bone mass, especially in patients who needed several treatments to control hypercortisolism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Instituto de Salud Carlos III (FIS 05/0448). M.J.B. was supported by a fellowship from CIRIT (FI 03/1102).

REFERENCES

- Canalis E, Giustina A 2001 Glucocorticoid-induced osteoporosis: Summary of a workshop. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:5681–5685.
- Chiodini I, Torlontano M, Carnevale V, Trischitta V, Scillitani A 2008 Skeletal involvement in adult patients with endogenous hypercortisolism. *J Endocrinol Invest* **31**:267–276.
- Mancini T, Doga M, Mazziotti G, Giustina A 2004 Cushing's syndrome and bone. *Pituitary* **7**:243–246.
- Shaker JL, Lukert BP 2005 Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am* **34**:341–356.
- Kristo C, Jemtland R, Ueland T, Godang K, Bollerslev J 2006 Restoration of the coupling process and normalization of bone mass following successful treatment of endogenous Cushing's syndrome: A prospective, long-term study. *Eur J Endocrinol* **154**:109–118.
- Manning PJ, Evans MC, Rei IR 1992 Normal bone mineral density following cure of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **36**:229–234.
- Vestergaard P, Lindholm J, Jorgensen JOL, Hagen C, Hoec HC, Laurberg P, Rejnmark L, Brixen K, Kristensen L, Feldt-Rasmussen U, Mosekilde L 2002 Increased risk of osteoporotic fractures in patients with Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* **146**:51–56.
- Di Somma C, Pivonello R, Loche S, Faggiano A, Klain M, Salvatore M, Lombardi G, Colao A 2003 Effect of 2 years of cortisol normalization on the impaired bone mass and turnover in adolescent and adults patients with Cushing's disease: A prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**:302–308.
- Hermus AD, Smals AG, Swinkels LM, Huysmans DA, Pieters GF, Sweep CF, Corstens FH, Kloppenborg PW 1995 Bone mineral density and bone turnover before and after surgical cure of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:2859–2865.
- Faggiano A, Pivonello R, Filippella M, Di Somma C, Orio F, Lombardi G, Colao A 2001 Spine abnormalities and damage in patients cured from Cushing's disease. *Pituitary* **4**:153–161.
- Arlt W, Rosenthal C, Hahner S, Allolio B 2006 Quality of glucocorticoid replacement in adrenal insufficiency: Clinical assessment vs timed serum cortisol measurements. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**:384–389.
- King JA, Wisniewski AB, Bankowski BJ, Carson KA, Zacur HA, Migeon CJ 2006 Long-term corticosteroid replacement and bone mineral density in adult women with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:865–869.
- Sciannamblo M, Russo G, Cuccato D, Chiumello G, Mora S 2006 Reduced bone mineral density and increased bone metabolism rate in young adult patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:4453–4458.
- Crown A, Lightman S 2005 Why is the management of glucocorticoid deficiency still controversial: A review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)* **63**:483–492.
- Lukert BP 2006 Editorial: Glucocorticoid replacement—How much is enough?. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:793–794.
- Mosteller RD 1987 Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* **317**:1098.
- Webb SM, Rigla M, Wagner AM, Oliver B, Bartumeus F 1999 Recovery of hypopituitarism after neurosurgical treatment of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:3696–3700.
- Van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C 2000 Oral corticosteroids and fracture risk: Relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology* **39**:1383–1389.
- Tauchmanova L, Pivonello R, Di Somma C, Rossi R, De Martino MC, Camera L, Klain M, Salvatore M, Lombardi G, Colao A 2006 Bone demineralization and vertebral fractures in endogenous cortisol excess: Role of disease etiology and gonadal status. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1779–1784.
- Minetto M, Reimondo G, Osella G, Ventura M, Angeli A, Terzolo M 2004 Bone loss is more severe in primary adrenal than in pituitary-dependent Cushing's syndrome. *Osteoporos Int* **15**:855–861.
- Ohmori N, Nomura K, Ohmori K, Kato Y, Itoh T, Takano K 2003 Osteoporosis is more prevalent in adrenal than in pituitary Cushing's syndrome. *Endocr J* **50**:1–7.
- Karavitaki N, Ioannidis G, Giannakopoulos F, Mavrokefalos P, Thalassinou N 2004 Evaluation of bone mineral density of the peripheral skeleton in pre- and postmenopausal women with newly diagnosed endogenous Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**:264–270.
- Chiodini I, Carnevale V, Torlontano M, Fusilli S, Guglielmi G, Pileri M, Modoni S, Di Giorgio A, Liuzzi A, Minisola S, Cammisa M, Trischitta V, Scillitani A 1998 Alterations of bone turnover and mass at different skeletal sites due to pure glucocorticoid excess: Study in eumenorrheic patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:1863–1867.
- Barahona MJ, Sojo L, Wagner AM, Bartumeus F, Oliver B, Cano P, Webb SM 2005 Determinants of neurosurgical outcome in pituitary tumors. *J Endocrinol Invest* **28**:787–794.
- Piovesan A, Terzolo M, Reimondo G, Pia A, Codegone A, Osella G, Boccuzzi A, Paccotti P, Angeli A 1994 Biochemical markers of bone and collagen turnover in acromegaly or Cushing's syndrome. *Horm Metab Res* **26**:234–237.
- Sartorio A, Ambrosi B, Colombo P, Morabito F, Faglia G 1988 Osteocalcin levels in Cushing's disease before and after treatment. *Horm Metab Res* **20**:70.
- Stewart PM 2003 Tissue-specific Cushing's syndrome, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action. *Eur J Endocrinol* **149**:163–168.
- Cooper MS, Rabbitt EH, Goddard PE, Bartlett WA, Hewison M, Stewart PM 2002 Osteoblastic 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure. *J Bone Miner Res* **17**:979–986.
- Osella G, Terzolo M, Reimondo G, Piovesan A, Pia A, Termine A, Paccotti P, Angeli A 1997 Serum markers of bone and collagen turnover in patients with Cushing's syndrome and in subjects with adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:3303–3307.
- Godang K, Ueland T, Bollerslev J 1999 Decreased bone area, bone mineral content, formative markers, and increased bone resorptive markers in endogenous Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* **141**:126–131.
- Di Somma C, Colao A, Pivonello R, Klain M, Faggiano A, Tripodi FS, Merola B, Salvatore M, Lombardi G 1998 Effectiveness of chronic treatment with alendronate in the osteoporosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **48**:655–662.

Received in original form January 15, 2009; revised form April 6, 2009; accepted May 1, 2009.

ANEXO I: GRAFICOS Y TABLAS

Tabla 1: Composición corporal, adipocinas y factores de riesgo cardiovascular. Comparación entre mujeres con SC curadas y activas y controles sanos apareados por edad y sexo:

	SC curadas	SC activas	Controles	p
N	37	14	85	
Masa grasa total (%)	39.7 ±7.4	39.4 ±5.8	35.7 ± 6.9	<0.01 ¹
Masa grasa troncular (%)	40.8 ±9	40.4 ±7.3	34.5 ± 8.8	0.001 ¹
Masa magra (Kg)	37.6 ±6.4	39.7 ±3.9	40.1 ± 5.3	NS
Adiponectina (ng/ml)	12.4(5-32.4)	12.6(8.2-26.2)	18.2(4.5-56.5)	<0.05 ^{1,2}
Visfatina (ng/ml)	15(8.5-24.5)	14(9.4-36)	13.4(7-59)	NS
sTNF-R1 (ng/ml)	1.71(1.07-4.28)	1.61(1.12-2.12)	1.21(0.79-2.47)	<0.001 ^{1,2}
sTNF-R2 (ng/ml)	2.92(1.65-11)	2.97(1.05-7)	2.74(1.62-5.59)	NS
IL-6 (pg/ml)	0.5(0.07-11.09)	0.44(0.17-6.74)	0.3(0.07-1.48)	<0.001 ^{1,2}
Insulina (pmol/l)	54(14-134)	66(14-212)	35(14-241)	<0.05 ^{1,2}
HOMA-IR	1.61(0.38-4.48)	2.08(0.36-7.09)	1.09(0.36-8.36)	NS(0.07)
Colesterol total (mmol/l)	5.8±0.9	5.4±0.7	5.4±0.9	NS
HDL-c (mmol/l)	1.6(1.2-2.8)	1.6(1.2-2.5)	1.7(0.8-3.2)	NS
LDL-c (mmol/l)	3.5±0.9	3.2±0.7	3.2±0.8	NS
Triglicéridos (mmol/l)	1.1(0.4-2.8)	1.0(0.5-3.8)	0.8(0.4-3.9)	NS
Apoproteína B (g/l)	1.01 ± 0.21	0.96 ± 0.16	0.89 ± 0.22	<0.05 ¹
Lipoproteína A (mg/l)	165(70-1144)	455(70-900)	136(70-1177)	NS
PA sistólica (mmHg)	130(100-160)	135(100-145)	120(90-154)	<0.05 ^{1,2}
PA diastólica (mmHg)	70(60-100)	77.5(70-100)	70(59-94)	<0.05 ^{2,3}
IMC (Kg/m²)	25.2(18.7-45.5)	29.6(23.7-34)	25.4(19-43)	NS
Edad actual (años)	50 ± 14	46 ± 12	50 ± 12	NS
Menopausia (%)	43	46	50	NS

NS- No significativo; HOMA-IR- Homeostasis Model Assessment of insulin resistance;

PA- presión arterial; IMC- índice de masa corporal.

Los resultados están expresados como media ± DE o mediana y rango en paréntesis.

¹p<0.05 entre SC curados y controles

²p<0.05 entre SC activas y controles

³p<0.05 entre SC curados y SC activas

Resumen: Las pacientes con SC curado, al igual que sucede con las pacientes con SC activo, tienen más masa grasa total y troncular que los controles sanos; menos adiponectina y más sTNF-R1 e IL-6 que los controles. Además, presentan niveles más elevados de insulina, más apoproteína B y tensión arterial sistólica que los controles.

Tabla 2: Comparación en mujeres estrógeno-deficientes entre pacientes con SC curado y activo y controles sanos apareados: papel de los estrógenos en la grasa corporal.

	SC curadas	SC activas	Controles	p
N	17	8	42	
Masa grasa total (%)	43 ±6	39.2±7	37.5±7	<0.05 ¹
Masa grasa troncular (%)	46±6	40.8±9	37.4±8	0.001 ¹
Masa magra (Kg)	37±7	39±4	40±5	NS
Adiponectina (ng/ml)	16(7-31)	13(8-19)	19(5-56)	NS
sTNF-R1 (ng/ml)	2(1.2-4.2)	1.5(1-2)	1.2(0.8-2.2)	<0.01 ^{1,3}
sTNF-R2 (ng/ml)	3.5(2-11)	3(1-3)	3(2-5)	NS
IL-6 (pg/ml)	0.5(0.07-11)	0.38(0.2-6.7)	0.29(0.07-1.2)	<0.05 ¹
Insulina (pmol/l)	68(14-134)	58(14-212)	34(14-241)	NS
HOMA-IR	2.2(0.4-4)	1.8(0.3-7)	1.1(0.3-8)	NS
PA sistólica (mmHg)	140(110-160)	130(100-135)	130(90-154)	<0.01 ^{1,3}
PA diastólica (mmHg)	75(60-100)	72.5(70-75)	70(59-94)	NS
Edad actual (años)	60±10	53±10	60±7.4	NS

Tabla 3: Comparación en mujeres estrógeno-suficientes entre pacientes con SC curado y activo y controles sanos apareados: papel de los estrógenos en la grasa corporal.

	SC curadas	SC activas	Controles	p
N	20	6	43	
Masa grasa total (%)	36.8±7	39.6±5	33.9±7	NS
Masa grasa troncular (%)	36.2±9	39.8±5	31.5±8	NS
Masa magra (Kg)	38±6	40.6±4	40±5	NS
Adiponectina (ng/ml)	11.5(5-32)	13(9.8-26)	17.6(4.5-49)	NS
sTNF-R1 (ng/ml)	1.4(1-2.7)	1.8(1.4-2)	1.18(0.8-2.4)	0.001 ^{1,2}
sTNF-R2 (ng/ml)	2.8(1.6-6)	3.3(2-7)	2.7(2-5)	NS
IL-6 (pg/ml)	0.5(0.1-1.8)	0.5(0.15-0.8)	0.37(0.17-1.4)	<0.05 ¹
Insulina (pmol/l)	43(14-86)	78(28-115)	35(14-131)	NS
HOMA-IR	1.4(0.4-2.5)	2.5(0.8-3.7)	1.06(0.4-4)	NS
PA sistólica (mmHg)	110(100-140)	140(130-145)	111(100-140)	<0.01 ^{2,3}
PA diastólica (mmHg)	65(60-85)	80(75-100)	70(60-90)	<0.01 ^{2,3}
Edad actual (años)	41±10	37±9	40±8.5	NS

¹p<0.05 entre SC curados y controles;

²p<0.05 entre SC activos y controles

³p<0.05 entre SC curados y activos

Resumen tabla 2 y 3: Las mujeres con SC curado estrógeno-deficientes tienen más masa grasa total y troncular que los controles, no existiendo estas diferencias en las mujeres con SC curado estrógeno-suficientes.

Tabla 4: Parámetros óseos y masa y densidad mineral óseas. Comparación entre mujeres con SC curadas y activas y controles sanos:

	SC curadas	SC activas	Controles	P
N	37	14	85	
CMO total (Kg)	1.88 ±0.31	1.79 ±0.20	2.05 ± 0.29	0.001 ¹
DMO total (g/cm²)	1.05 ±0.09	1.02 ±0.06	1.11 ± 0.09	0.001 ¹
DMO lumbar (g/cm²)	1.05 ±0.18	0.92 ±0.10	1.11 ± 0.20	<0.01 ²
Osteocalcina (ng/ml)	2 (2-10.6)	2 (2-15.4)	4.07 (2-14.7)	<0.01 ¹
beta-Crosslaps (ng/ml)	0.26 (0.02-0.58)	0.28 (0.03-1.05)	0.27 (0.09-1.02)	NS
P1NP total (ng/ml)	39.8 (6.34-111)	32.7 (13.7-114)	42.4 (12.5-192)	NS
IMC (Kg/m²)	25.2 (18.7-45.5)	29.6 (23.7-34)	25.4 (19-43)	NS
Edad actual (años)	50 ± 14	46 ± 12	50 ± 12	NS
Menopausia (%)	43	46	50	NS

¹p<0.05 entre controles y los otros dos grupos; ²p<0.05 entre controles y SC activos

Resumen: Las pacientes con SC curado, al igual que las de fase activa, tienen menor contenido y densidad mineral ósea, y niveles inferiores de osteocalcina que los controles sanos.

Tabla 5: Masa y densidad mineral óseas. Comparación entre mujeres con SC curadas y activas y controles sanos: Papel de los estrógenos (estrog+: estrógeno-suficientes, estrog-: estrógeno-deficientes).

	SC curadas		SC activas		Controles		P ^a	P ^b
Estado gonadal	Estrog+	Estrog-	Estrog+	Estrog-	Estrog+	Estrog-		
N	20	17	6	8	43	42		
CMO (Kg)	1.96 ±0.22	1.79±0.38	1.83 ±0.26	1.76±0.15	2.15 ± 0.29	1.94±0.24	<0.01 ¹	NS
DMO total (g/cm ²)	1.07 ±0.06	1.03±0.11	1.05 ±0.08	1.01±0.05	1.14 ± 0.08	1.07±0.09	<0.01 ¹	NS
DMO lumbar (g/cm ²)	1.06±0.17	1.05±0.2	0.96±0.08	0.89±0.1	1.17±0.17	1.04±0.2	<0.01 ¹	NS

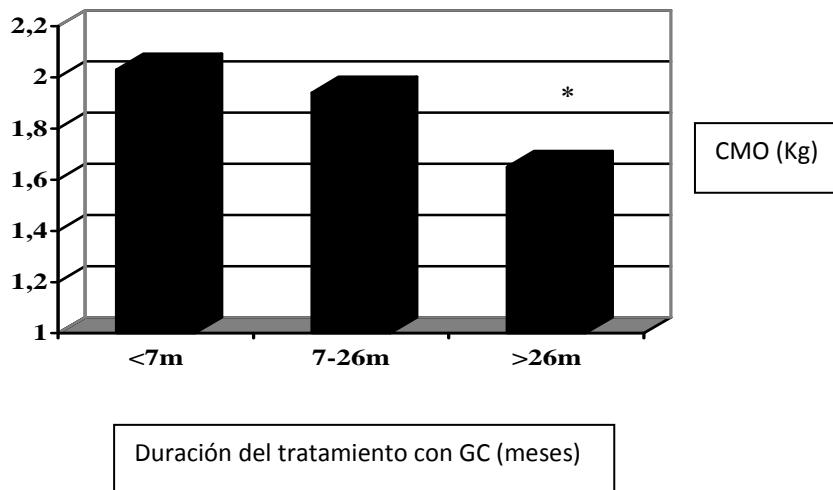
a- Diferencias entre los grupos estrógeno-suficientes de las pacientes curadas y activas y los controles.

b- Diferencias entre los grupos estrógeno-deficientes de las pacientes curadas y activas y los controles.

¹p<0.01 entre controles y los otros dos grupos

Resumen: Las mujeres con SC tanto curadas como activas del grupo estrógeno-suficiente tienen menos contenido mineral óseo, y menos densidad mineral ósea total y lumbar que los controles. Sin embargo, no se observaron estas diferencias en las pacientes estrógeno-deficientes.

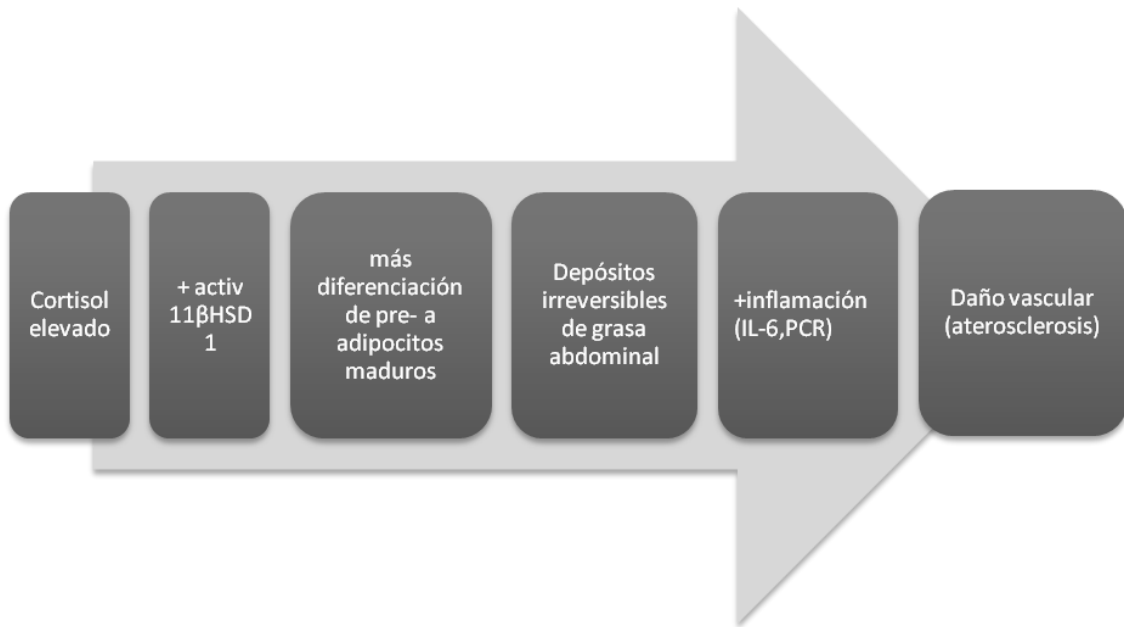
Figura 1: Asociación entre el contenido mineral óseo (CMO) y la duración en meses del tratamiento con glucocorticoides, dividido mediante tertiles en 3 grupos:



* $p < 0.05$ respecto los otros 2 grupos

Resumen: El grupo de mayor duración del tratamiento con GC tiene menor CMO que los otros dos grupos de menor duración.

Figura 2: Mecanismo patogénico que explicaría la formación de depósitos grasos abdominales y la consiguiente inflamación.



ANEXO II

Basado en el artículo:

Barahona MJ, Resmini E, Sucunza N, Webb SM. Diagnosis of cure in Cushing's syndrome: lessons from long-term follow-up. *Front Horm Res* (in press).

Incluye:

- Resumen del artículo
- Copia del artículo

Diagnóstico de curación en el síndrome de Cushing: lecciones del seguimiento a largo plazo:

En este artículo se revisaron retrospectivamente las historias clínicas de pacientes con SC endógeno que habían sido tratados en nuestro hospital desde 1982. Se excluyeron los carcinomas adrenales por su peor pronóstico. En total se identificaron 98 pacientes con SC endógeno: 73 de origen hipofisario, 23 de origen suprarrenal y 2 de origen ectópico; la edad media al diagnóstico del SC fue de 38 ± 13 años; 83 eran mujeres. La mortalidad en nuestra serie fue del 5% (5 pacientes). Un hombre con enfermedad de Cushing (EC) no curada murió a los 36 años por la rotura de un aneurisma de aorta, una mujer con EC curada murió a los 38 por una trombosis mesentérica, y otra mujer con EC curada sufrió una muerte súbita cardíaca a los 55 años. Los otros 2 pacientes (una mujer con SC no curado de origen ectópico y una mujer curada con hiperplasia macronodular bilateral) murieron a los 56 años por progresión de una enfermedad tumoral, y a los 61 de una sepsis secundaria a una pancreatitis aguda, respectivamente. Por tanto, la media de edad en el momento del fallecimiento de estos pacientes fue de 49 años. Tres de las 5 muertes fueron de origen cardiovascular (de estos pacientes 2 estaban curados); además los 3 pacientes con SC curado tuvieron el cortisol normal durante una media de 9.5 años en el momento del fallecimiento. Parece por tanto, que persiste el daño cardiovascular a pesar de años después del control del hipercortisolismo.

La prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en nuestra cohorte de 98 pacientes al diagnóstico del SC fue la siguiente: 18% de los pacientes tenían diabetes franca, 63% hipertensión arterial y 38% dislipidemia. La morbilidad cardiovascular durante el seguimiento fue importante: 3% de cardiopatía isquémica, 3% de ictus, 6% trombosis y 2% enfermedad vascular arterial periférica.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio caso-control con los 61 pacientes que en el momento de realizar el estudio continuaban controlándose en nuestro centro (5 habían fallecido y 32 se habían perdido en el seguimiento, muchos de ellos pacientes de otras regiones que tras conseguir la curación volvieron a controlarse por sus anteriores médicos), y se incluyeron 106 controles sanos apareados por edad y sexo, procedentes de la base de datos del banco de sangre de nuestro hospital. Se analizó la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en los pacientes curados (antes y después de la curación) y se comparó con sus respectivos controles. La prevalencia de diabetes, dislipemia e hipertensión arterial fue más alta al diagnóstico de SC que tras la curación y en los controles (9% vs 4.5% y 2%, $p<0.05$; 50% vs 38.6% y 21%, $p<0.001$; 59% vs 27.3% y 14%, $p<0.01$). Los controles tenían una prevalencia inferior de obesidad central que los pacientes al diagnóstico y después de la curación (31% vs 46.5% vs 50%, $p<0.05$). Los pacientes con SC curado tenían mayor prevalencia de dislipemia y obesidad central que los controles ($p<0.05$).

DIAGNOSIS OF CURE IN CUSHING'S SYNDROME: LESSONS FROM LONG-TERM FOLLOW-UP

M.J. Barahona¹, E. Resmini, N. Sucunza², S.M. Webb.

Endocrinology and Medicine Departments and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER, Unidad 747), ISCIII, Barcelona; Hospital Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Current Addresses: ¹Dept. Endocrinology, Hospital Mútua de Terrassa, Pz. Dr Robert 5, 08221-Terrassa, 08221-Terrassa, Barcelona, and ²Dept. Endocrinology, Hospital Manacor, Carretera de Palma a Artà s/n, 07500-Manacor, Mallorca. Spain

Short title: Long-term cure in Cushing's syndrome

Full address of corresponding author:

Susan M Webb

Department of Endocrinology, Hospital Sant Pau

Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Phone: + 34-93-5565661

Fax: + 34-93-5565602

Email: swebb@santpau.cat

Supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS 05/0448). M.J. Barahona was supported by a fellowship from CIRIT (FI 03/1102).

Abstract

It is generally assumed that endocrine “cure” of hypercortisolism after successful treatment for Cushing’s syndrome (CS) is associated with reversal of increased morbidity and mortality, typical of the active disease. However, recent data do not support this idea; increased cardiovascular risk is still present 5 years after endocrine cure, and health related quality of life (HRQoL), although improved when compared to the active phase of hypercortisolism, is still impaired when compared to normal population. Abnormal body composition typical of hypercortisolism (i.e., increased total and trunk fat, reduced bone mass and lean body mass) is not completely normalized, even years after controlling hypercortisolism. Thus, control of hypercortisolism in CS does not normalize HRQoL, long term cardiovascular risk and morbidity, body composition nor some metabolic parameters. Whether the same occurs in patients exposed to pharmacological doses of exogenous glucocorticoids, and whether the body composition abnormalities associated with the exposure to exogenous glucocorticoids are reversible or not, are worth considering.

Introduction

The prognosis of Cushing's syndrome (CS) has improved over the years; however, patients may be exposed to hypercortisolism for a long time before definite treatment is efficient. The long-term consequences of prior chronic hypercortisolism are currently unclear, although there is some evidence that it does impair health. Historically, both morbidity and mortality were increased in patients who suffered CS (1-4), and the main reported cause of death is cardiovascular. Since it is a rare disease, it is difficult to obtain long series where this issue may be approached, and contributes to explain some discordant results (1). Others have not observed increased mortality (5, 6). One study carried out in 15 patients with CS and 2 control groups (sex- and age-matched and BMI-matched controls) of 30 individuals showed that despite attaining normal cortisol, hypertension, low HDL-cholesterol, diabetes mellitus, insulin resistance and carotid atheromatosis persisted after 5 years (7). It has been recently demonstrated that health-related quality of life (HRQoL) is severely affected in CS, and is influenced, among other things, by disease duration, gender and age, and may not normalize despite hormonal "control" of the disease (8, 9). In this paper we report the morbidity at diagnosis of CS and mortality and further morbidity several years after treatment for hypercortisolism in our cohort of CS; furthermore, in a collaborative study with different European reference centres, we have performed a transversal evaluation of HRQoL in patients who have suffered CS (9).

a) Retrospective study of morbidity and mortality in our cohort of Cushing's syndrome

We retrospectively reviewed the clinical records of patients with endogenous CS treated at our hospital since 1982. Patients with pituitary-dependent disease, as well as adrenal

tumours and ectopic-ACTH secreting tumours were included, but not adrenal carcinomas due to their worse prognosis. A total of 98 CS patients were identified (mean age at diagnosis of CS: 38 ± 13 years; 83 women; 73 of pituitary origin, 23 of adrenal origin -2 of which were bilateral- and 2 of ectopic origin); of these 98 patients, 5 had died and 32 were lost to follow-up (including patients from other regions of Spain who after successful operation were in remission of hypercortisolism and followed by their previous physicians); of the remaining 61 patients, 17 were hypercortisolemic (14 women, 4 of which had recurred; 14 of pituitary and 3 of adrenal origin) and 44 were in remission (37 women; 34 of pituitary and 10 of adrenal origin). The prevalence of cardiovascular risk factors in our cohort of 98 patients at diagnosis of CS is summarized in Table 1; 18% of patients had overt diabetes, 63% arterial hypertension and 38% dyslipidemia. For comparison, the same data corresponding to our acromegaly cohort, followed in our centre since 1982 are presented. While prevalence of hypertension and dyslipidemia are similar, diabetes was more prevalent in acromegaly than in CS, indicating a greater effect of GH than cortisol on glucose intolerance.

b) Prospective case-control study of our patients with Cushing's syndrome

We also conducted a case-control study including the 61 patients with CS diagnosed and controlled in our centre (17 active and 44 cured) and 106 healthy gender and age-controls which were selected among the blood donors database at our hospital. Letters were sent to selected controls, and a phone call was made one week later; the first control to accept was included. Controls that referred glucocorticoid (GC) treatment or malignant disease were excluded. All patients signed an informed consent after study approval by the hospital ethics committee. In cured CS, mean age at the time of study was 50 ± 14 years, while mean age at the time of CS diagnosis was 36 ± 12 years; mean

time of hormonal cure of hypercortisolism was 11 ± 6 years. Mean BMI was 28 ± 6 Kg/m² and waist circumference 94 ± 14 cm. In these patients whole body composition was evaluated by dual-energy x-ray absorptiometry scanning (DEXA, Delphi QDR 4500, Hologic).

Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 statistical package for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Quantitative data are expressed as mean and SD (Gaussian distribution) or as median and range (non-Gaussian distribution), and qualitative data, as percentages. Data distribution was analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons between 2 groups were performed using Student's t (Gaussian distribution) and Mann-Whitney's U (non-Gaussian distribution). A Chi-squared test was performed for categorical variables.

The cardiovascular (CV) morbidity of our cohort of patients after a mean 11 years of follow-up was important (Table 1), namely 3% of ischemic heart disease, 3% of stroke, 6% thrombosis and 2% peripheral arterial vascular disease. The mortality of our series was 5% (5 patients). One male with non-cured Cushing's disease (CD) died of a ruptured aortic aneurism at age 36, a cured female with CD aged 38 from mesenteric thrombosis, and another cured female with CD suffered a sudden cardiac death at age 55. The other 2 patients (one non-cured female with ectopic-ACTH secretion and one cured female with bilateral macronodular hyperplasia) died at age 56 from progression of tumoural disease, and at age 61 from sepsis after acute pancreatitis, respectively. Thus, median age at death was 49 years, 3 of the 5 deaths were of CV origin (of which 2 were cured) and the 3 patients with cured CS had normal cortisol for a mean of 9.5 years at the time of death. It would appear therefore, that serious cardiovascular damage persisted, years after control of hypercortisolism.

The comparison between CS and acromegaly regarding mortality and cardiovascular morbidity is also represented in Table 1. In the case-control study group (n= 61), we analyzed the prevalence of CV risk factors only in cured patients (before and after cure) and compared it with gender- and age-matched controls. The prevalence of diabetes, dyslipidemia and hypertension was higher at diagnosis of CS than after cure and in controls (9% vs 4.5% and 2%, $p<0.05$; 50% vs 38.6% and 21%, $p<0.001$; 59% vs 27.3% and 14%, $p<0.01$). Controls had less prevalence of central obesity than patients at diagnosis of CS and after cure (31% vs 46.5% vs 50%, $p<0.05$). Patients with cured CS had more prevalence of dyslipidemia and central obesity than controls ($p<0.05$). No statistical differences were observed between both groups regarding prevalence of diabetes and hypertension (Figure 1). Furthermore, patients with cured Cushing's syndrome had higher total and trunk fat mass percentage and less lean body mass and bone mineral content than controls despite the same BMI (27.8 ± 6 vs. 26.5 ± 5 Kg/m² in controls) (10), indicating that despite disappearance of hypercortisolism, body composition abnormalities do not revert to normal. These findings suggest that the changes induced by sustained hypercortisolism are irreversible, and persist after endocrine cure. How long hypercortisolism should be present to induce these changes is currently unknown, but seems a strong argument to attain an earlier diagnosis of CS, before irreversible morbidity occurs.

c) Health-related QoL in patients with Cushing's syndrome:

Using the generic SF-36 questionnaire, impairment of QoL was observed in patients with CS which was greater in active than in cured patients, and did not normalize, even after long-term control of hypercortisolism (11, 12). With a recently described disease-generated questionnaire (CushingQoL) HRQoL was evaluated in 125 patients with CS

in clinical practice conditions, recruited from Spain, France, Germany, The Netherlands and Italy, in an observational, international, cross-sectional study over a 2 month period (9). Clinical and hormonal data were collected and correlated with results of a generic questionnaire (SF-36), a question on self-perceived general health status and the CushingQoL score. A significant correlation was observed between CushingQoL score and patients self-perceived general health status and dimensions of SF-36. Patients with current hypercortisolism scored worse (lower) than those without, and a linear regression analysis identified female gender and current hypercortisolism as significant predictors for worse QoL.

Conclusions

High prevalence of cardiovascular risk factors are present in patients with active CS, and persist after long-term remission of hypercortisolism, mainly dyslipidemia and central obesity, as shows our case-control study. Of special interest is the fact that despite a mean of cure of 11 years the prevalence of increased trunk fat and decreased bone mass persist abnormal as in the active phase of CS. This persistent central obesity is a common complaint of patients exposed to hypercortisolism. Moreover, HRQoL is worse in patients with active disease, but is still impaired once the patients have been successfully treated for CS, compared to normal healthy populations. These findings may have practical implications, since it would be necessary to ascertain whether the same occurs in patients exposed to pharmacological doses of exogenous glucocorticoids.

References

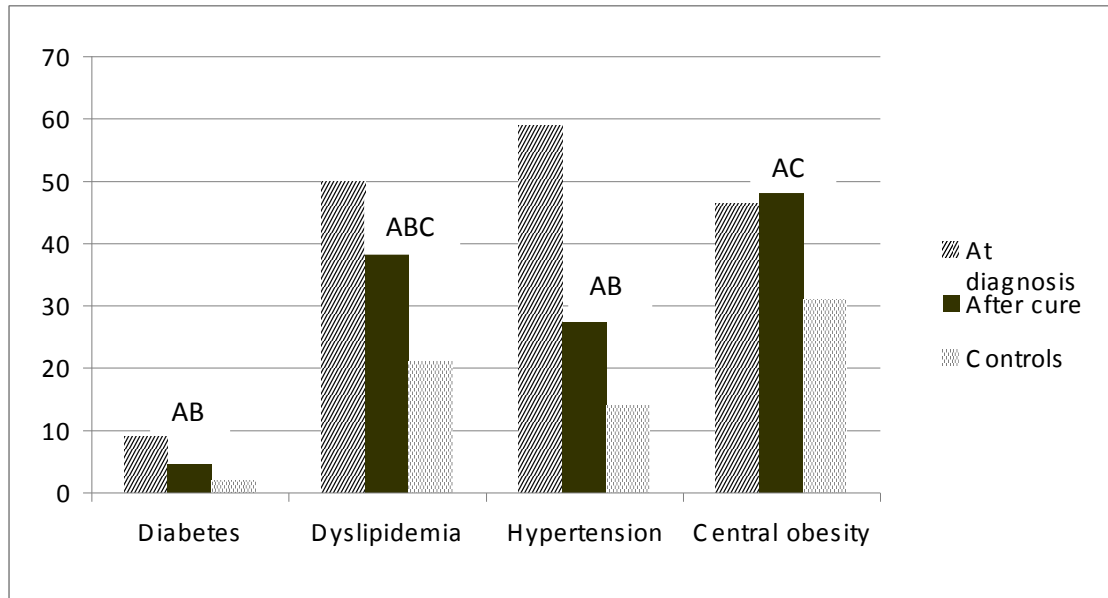
- 1- Etxabe J, Vázquez JA: Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach. *Clin Endocrinol* 1994; 40; 479-84.
- 2- Ambrosi B, Sartorio A, Pizzocaro A, Passini E, Bottasso B: Evaluation of haemostatic and fibrinolytic markers in patients with Cushing's syndrome and in patients with adrenal incidentaloma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108; 294-98.
- 3- Cavagnini F, Pecori-Giraldi F. Epidemiology and follow-up of Cushing's disease. *Ann Med* 2001; 62; 168-72.
- 4- Rees DA, Hanna FW, Davies JS, Mills RG, Vafidis J, Scanlon: Long-term follow-up results of transsphenoidal surgery for Cushing's disease in a single centre using strict criteria for remission. *Clin Endocrinol* 2002; 56; 541-51.
- 5- Swearingen B, Biller BMK, Barker FG, Katznelson L, Grinspoon S, Klibanski A, Zervas NT; Long-term mortality after transsphenoidal surgery for Cushing's disease. *Ann Intern Med* 1999; 245; 821-4.
- 6- Pikkarainen L, Sane T, Reunanen A; The survival and well-being of patients treated for Cushing's syndrome. *J Intern Med* 1999; 245; 463-8.
- 7- Colao A, Pivonello R, Spiezia S, Faggiano A, Ferone D, Filippella M, Marzullo P, Cerbone G, Siciliani M, Lombardi G; Persistence of increased cardiovascular risk in patients with Cushing's disease after five years of successful cure. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84; 2664-72.

- 8- Van Aken MO, Pereira AM, Biermasz NR, van Thiel SW, Hoftijzer HC, Smit JW, Roelfsema F, Lamberts SW, Romijn JA; Quality of life in patients after long-term biochemical cure of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90; 3279-86.
- 9- Webb SM, Badia X, Barahona MJ, Colao A, Strasburger CJ, Tabarin A, van Aken MO, Pivonello R, Stalla G, Lamberts SWJ, Glusman JE; Evaluation of Health-Related Quality of Life in Patients with Cushing's syndrome with a new questionnaire (CushingQoL). *Eur J Endocrinol* 2008; 158; 623–630
- 10- Barahona MJ, Sucunza N, Farrerons J, Lluch P, Puig T, Wägner AM, van Elzelingen C, Fernández-Real JM, Webb S;. Increased fat mass in women with “cured” Cushing's syndrome. European Neuroendocrine Association meeting, Athens, *Hormones* 2006 5 suppl 1: 74-5 (Abstract).
- 11- Lindsay JR, Nansel T, Baid S, Gumowski J, Nieman LK; Long-term impaired quality of life in Cushing's syndrome despite initial improvement after surgical remission. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91; 447-53.
- 12- . Lindholm J, Juul S, Jorgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, Hagen C, Jorgensen J, Kosteljanetz M, Kristensen L, Laurberg P, Schmidt K, Weeke J. Incidence and late prognosis of Cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86; 117-123.

Table 1: Morbidity at diagnosis of Cushing’s syndrome and mortality and morbidity after follow-up in patients operated and followed since 1982; for comparison the same data corresponding to the acromegaly cohort of our centre(Hospital S Pau, Barcelona) are also shown. CV Cardiovascular.

	Cushing’s Sd. (n=98)	Acromegaly (n=99)
At diagnosis:		
Diabetes mellitus	18%	34%
Hypertension	63%	62%
Dyslipidemia	38%	33%
At follow-up:		
Ischemic heart disease	3%	4%
Stroke	3%	2.5%
Thrombosis	6%	0%
Peripheral arterial vascular disease	2%	2.4%
Death/CV cause	5%/60%	10%/ 56%
Median age at death	49	62
Mean age at diagnosis	38 ± 13 years	42 ± 12 years
Mean follow-up	11 ± 6 years	14.5 ± 9.3 years

Figure 1: Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with CS at diagnosis and after long-term of cure and comparison with that of healthy age and sex-matched controls



A- $p < 0.05$ between patients with CS at diagnosis and controls

B- $p < 0.05$ between patients with CS at diagnosis and after cure

C- $p < 0.05$ between patients after cure of CS and controls