



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

**ANOMALÍAS DE LA SUSTANCIA BLANCA CEREBRAL EN EL
SÍNDROME DE CUSHING EN RELACIÓN A SINTOMATOLOGÍA
PSIQUIÁTRICA Y RENDIMIENTO COGNITIVO**

Tesis presentada por:

Patricia Pires Encuentra

Directoras de tesis:

Profa. Susan Webb Youdale y Profa. Beatriz Gómez-Ansón

Programa de Doctorat en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2017

Dra. Susan Webb Youdale, Catedrática de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, Servicio de Endocrinología, Hospital de Sant Pau (CIBERER Unidad 747) y Dra. Beatriz Gómez- Ansón, Servicio de la Unidad de Neurorradiología del Hospital de Sant Pau IIB-Sant Pau y Universitat Autònoma de Barcelona, declaran haber supervisado esta tesis doctoral, titulada “ANOMALÍAS DE LA SUSTANCIA BLANCA CEREBRAL EN EL SÍNDROME DE CUSHING EN RELACIÓN A SINTOMATOLOGÍA PSIQUIÁTRICA Y RENDIMIENTO COGNITIVO”, presentada por Patricia Pires Encuentra. Así como declaran que esta tesis cumple con los requisitos necesarios para ser defendida al fin de obtener el grado de Doctor.

Firma,

Profa. Susan Webb Youdale
Universitat Autònoma de Barcelona
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
(CIBERER 747)

Profa. Beatriz Gómez-Ansón
Universitat Autònoma de Barcelona
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
(IIB-Sant Pau)

Barcelona 19 Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

Gracias es, a mi modo de ver, una de las palabras más importantes de nuestro vocabulario. Este trabajo de investigación se ha construido, como todos, ladrillo a ladrillo y, ahora, una vez acabado, resulta asombroso contemplar la torre entera. ¿Magia? No. Trabajo constante y en equipo. No os puedo estar más agradecida.

Gracias ante todo a mis directoras de tesis, a la Dra. Beatriz Gómez-Ansón, que fue quien me dio la oportunidad de trabajar en el campo de la ciencia que más me apasiona: la neuroimagen. Tener a alguien de tanta calidad a la cabeza facilita mucho el trabajo. Gracias a la Dra. Susan Webb, por el mismo motivo, permitirme realizar uno de mis sueños: poner mi granito de arena investigando. Gracias por tu fuerza y profesionalidad. Modelo de mujer poderosa.

Gracias Ali. Por todo. Por tu personalidad, trabajo, esfuerzo, por tu paciencia y por tu dulzura. Por estar ahí, con tu mente y con tu alma. La has puesto en este proyecto. Gracias por tus palabras de apoyo cuando todo se hacía muy cuesta arriba.

Gracias Eugenia e Iris, por los momentos de complicidad compartidos entre aquellas paredes prefabricadas.

Gracias al PIC. Al profesor Manuel Delfino y la Dra. Yolanda Vives por permitirme subir y zarpar en ese barco durante cuatro años. A los *Pic members*. En especial, a Aitor. Fue todo un hallazgo descubrirte, estando tan cerca. Me has ayudado muchísimo: una explicación tuya de diez minutos aclaraba multitud de dudas. Gracias por tu tiempo como profesor y como amigo. Y por todos esos pitis y charlas en la puerta del Edificio D. Gracias también a mis otros *pic members* favoritos: Christian, Campos, Nadia, Pau, estrellas en la tierra. Xavi, gracias por tus explicaciones sobre la galaxia. Eres un claro

ejemplo de que el esfuerzo tiene siempre recompensa. Gracias a todos los demás por los momentos compartidos, Fernando, Esther, Paco, Raquel, Caubet, Jordis... Ada, gracias por ser siempre atenta y generosa. Verdaderamente, eres un hada. María, gracias a ti también por *tus buenas compañías* junto a Joaquin Sabina.

Roser, muchísimas gracias por tu ayuda en los inicios, fueron los momentos más duros.

Y a ti, Cristian, mi querido compañero de piso, amigo, una de las personas más bellas que me he encontrado. Me dio luz y motivación para comenzar todo. Sabía que llegarías lejos.

Gracias a mi familia. A mi madre, por ser un ejemplo a seguir, por su forma de ser, una madre de alta costura. A mis abuelos, por su apoyo y cariño, por su empeño en que este trabajo saliera adelante. A Elvira. Gracias por apoyarme y ayudarme a salir adelante en algunos momentos en los que me hundía: salí a flote gracias a ti.

Por supuesto, quiero agradecer infinitamente a todos los voluntarios, pacientes y controles de este proyecto por dar su cuerpo y su alma. Espero que este trabajo sirva para mejorar algo, aunque sea solo un poco, su calidad de vida futura.

Gracias a todos los que un día participaron en proyectos de investigación, animales y personas y para que algún día tendamos a prescindir de la investigación con los primeros para una ciencia más moral, ética y humana.

La presente tesis ha sido realizada gracias a la concesión de subvenciones del ISCIII, Ministerio de Ciencia e Innovación español (MICINN, FIS080302 y FIS 070770) y la Comisión Europea (ERCUSYN PHP800200).

LISTA DE PUBLICACIONES

Esta Tesis doctoral está basada en un compendio de dos artículos publicados:

- 1) Pires, P., Santos, A., Vives-Gilabert, Y., Webb, S. M., Sainz-Ruiz, A., Resmini, E., Crespo I., de Juan-Delago M., Gómez-Anson, B. White matter alterations in the brains of patients with active, remitted, and cured cushing syndrome: a DTI study. American Journal of Neuroradiology 2015 Jun;36(6):1043-8. doi: 10.3174/ajnr.A4322. IF= 3.124

- 2) Patricia Pires, Alicia Santos, Yolanda Vives-Gilabert, Susan M Webb, Aitor Sainz-Ruiz, Eugenia Resmini, Iris Crespo, Manel de Juan-Delago and Beatriz Gómez-Anson. White matter involvement on DTI-MRI in Cushing's syndrome relates to mood disturbances and processing speed: a case-control study. Pituitary, 2017 Jun;20(3):340-348. doi: 10.1007/s11102-017-0793-y. IF= 3.407

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
AD	Difusividad Axial
ADC	Coeficiente de Difusión Aparente
ATR	Radiación Talámica Anterior
BDI-II	Beck Depression Inventory-II
BET	Brain Extraction Tool
Cho	Colina
Cr	Creatina
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CST	Tracto Corticoespinal
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DTI	Imágenes con Tensor de Difusión
EC	Enfermedad de Cushing
EPI	Imágenes Eco-Planar
FA	Anisotropía Fraccional
FDT	FMRIB Diffusion Toolbox
FOV	Field of View
FSL	FMRIB Software Library
FWE	Family Wise Error
GC	Glucocorticoides
GLM	Modelo Lineal General
Glx	Glutamato + Glutamina
HHA	Hipotálamo-Hipofisario-Adrenal

IFOF	Fascículo Fronto-Occipital Inferior
ILF	Fascículo Longitudinal Inferior
IMC	Índice de Masa Corporal
Ktz	Ketoconazol
MD	Difusividad Media
MRI	Imágenes de Resonancia Magnética
Mtp	Metopirona
NAA	N-acetil-aspartato
NIFTI	Neuroimaging Informatics Technology Initiative
PIC	Port d'Informació Científica
RD	Difusividad Radial
SB	Sustancia Blanca
SC	Síndrome de Cushing
SDMT	Symbol Digit Modalities Test
SLF	Fascículo Longitudinal Superior
SNC	Sistema Nervioso Central
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAI	<i>State-Trait</i> Anxiety Inventory
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TBSS	Tract-based Spatial Statistics
TDM	Trastorno Depresivo Mayor
TFCE	Threshold-Free Cluster Enhancement
UF	Fascículo Uncinado
WAIS	Wechsler Adult Intelligence Scales

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
LISTA DE PUBLICACIONES	7
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)	15
1.1 Análisis de la sustancia blanca: Imágenes con Tensor de Difusión (DTI)	15
1.2 Difusión isotrópica versus anisotrópica.....	17
1.3 Mapas de difusión.....	19
2. El Síndrome de Cushing (SC)	23
2.1 Definición, epidemiología y cuadro clínico.....	23
2.2 Etiología y tratamiento	24
2.3 Anomalías cerebrales en el Síndrome de Cushing	27
2.4 Afectación psiquiátrica y cognitiva en el Síndrome de Cushing.....	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
1. Hipótesis:	35
2. Objetivos:	37
MÉTODOS.....	39
1. Sujetos	41
2. Adquisición y procesamiento de las imágenes	43
2.1 Adquisición de las imágenes MRI	43
2.2 Procesamiento de las imágenes de DTI	43
3. Exploración psiquiátrica y cognitiva.....	45
3.1 Sintomatología Depresiva.....	45

3.2 Sintomatología Ansiosa	46
3.3 Velocidad de Procesamiento de la Información	46
4. Análisis estadístico	47
4.1 Análisis estadístico de las variables demográficas, clínicas, neuropsiquiátricas y cognitivas.....	47
4.2 Análisis estadístico de los datos de DTI	48
RESULTADOS.....	51
1. Análisis 1. Diferencias en el conjunto de pacientes con SC y controles.....	53
1.1 Diferencias demográficas y clínicas.....	53
1.2 Diferencias en los mapas de DTI.....	53
2. Análisis 2. Diferencias entre SC activo, SC controlado, SC curado y controles	57
2.1 Diferencias demográficas y clínicas.....	57
2.2 Diferencias en los mapas de DTI.....	59
3. Análisis 3. Relación entre valores de la sustancia blanca (FA, MD, AD y RD) y la exposición a cortisol (cortisol en orina de 24 horas y duración de la enfermedad en meses).	68
4. Análisis 4. Evaluación neuropsiquiátrica (depresión y ansiedad) y cognitiva (velocidad de procesamiento de la información)	68
5. Análisis 5. Relación entre los valores de sustancia blanca (FA, MD, AD y RD) y la sintomatología depresiva, ansiosa y rendimiento cognitivo.....	70
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS	93
ARTÍCULOS PUBLICADOS	107

INTRODUCCIÓN

1. Imágenes de Resonancia Magnética (MRI)

La Resonancia Magnética (MR) es un conjunto de técnicas no invasivas, que permiten obtener diferentes tipos de imagen para proporcionar información *in vivo*, tanto estructural (de volumen y forma, entre otros), así como **funcional**, con el fin de establecer indicadores neurofisiológicos y detectar así las alteraciones patológicas en diversos contextos clínicos.

1.1 Análisis de la sustancia blanca: Imágenes con Tensor de Difusión (DTI)

Las **Imágenes con Tensor de Difusión (DTI)** son una de las técnicas funcionales de MRI. Esta detecta y dibuja los tractos o fibras de **Sustancia Blanca (SB)**, llamada así por su particularidad de estar constituida fundamentalmente por compuestos de mielina, que son lípidos de membrana que recubren los axones neuronales. La SB cerebral constituye el entramado de conexiones axonales, por el cual las neuronas se intercomunican. La técnica DTI muestra dichas conexiones regionales, representando mapas estructurales y dando así un valor a su funcionalidad conectiva (Figuras 1 y 2).

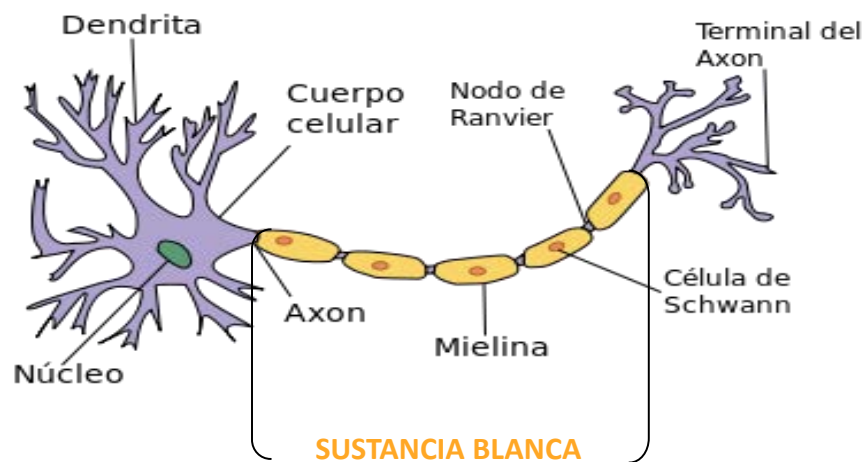


Figura 1. Diagrama básico de una neurona (adaptado de <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/nervous/tissue.html>).



Figura 2. Imágenes de los trabajos de Ramón y Cajal de neuronas teñidas con material argirófilo donde se aprecian las primeras estructuras y conexiones neuronales (extraído de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/2398/1/Una-breve-historia-de-la-Sinapsis.html>).

Así, la técnica de DTI (Basser et al., 1994) permite obtener imágenes de las estructuras cerebrales mediante la detección del movimiento de las moléculas de agua que circulan dentro de los tejidos biológicos, haciendo posible una reconstrucción del estado de las fibras del sistema nervioso y definiendo su integridad celular o su patología (Johansen-Berg & Rushworth, 2009; Le Bihan et al., 1986).

1.2 Difusión isotrópica versus anisotrópica

Las moléculas de agua se difunden libremente y en las todas direcciones del espacio cerebral cuando no existen restricciones; a esta dispersión se llama difusión isotrópica, tal como ocurre en los ventrículos que contienen líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, dependiendo del tejido, por ejemplo, en el caso de existir barreras biológicas como sucede en las fibras nerviosas miélicas del Sistema Nervioso Central (SNC), dichas moléculas de agua se moverán en una dirección preferente a través del axón, lo que se llama difusión anisotrópica (Le Bihan, 2003). El valor de la difusión se detecta a partir de la facilidad o no del movimiento del agua en una dirección determinada, mostrando así, anisotropía o isotropía, respectivamente (Figura 3).

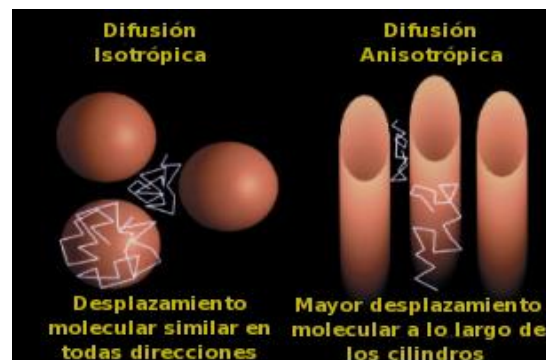


Figura 3. Muestra de dos tipos diferentes de difusión; difusión isotrópica, donde las moléculas se desplazan de manera similar en todas direcciones y difusión anisotrópica, mostrando una preferencia direccional debido a la presencia de barreras estructurales, como ocurre en la difusión preferente a través de los axones (Tomada de Beaulieu, 2002).

Los valores de la difusión van de 0 a 1, siendo el 0 un valor muy isotrópico (sin restricción en la difusión) y 1 un valor muy anisotrópico, es decir con mucha preferencia en una dirección determinada.

La técnica de DTI, constituye un **modelo teórico**, representado en forma de elipsoide, que corresponde a la posibilidad de las moléculas de agua a moverse a lo largo de las tres posibles direcciones/ejes del espacio (3D). De esta manera, el elipsoide, constituye la información de tres vectores (llamados *eigenvectors*) correspondientes al espacio de difusión, que podrá representar preferencia de difusividad a través de la dirección de movimiento principal (λ_1) y paralelo a las fibras ($//$) o bien a través de las direcciones secundarias (λ_2 y λ_3) perpendiculares (\perp) con respecto a la dirección principal (i.e. perpendicular a la fibra). (Figura 4).

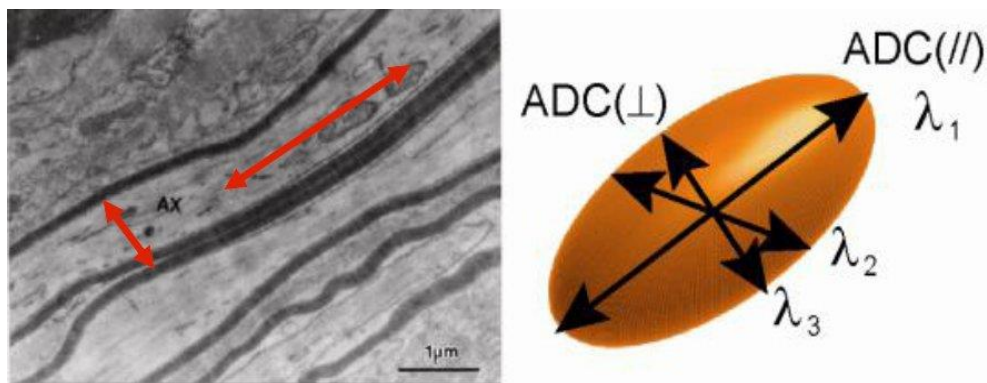


Figura 4: Izquierda: Tejido biológico por el que transcurren las moléculas de agua. Derecha: El elipsoide representa la posibilidad de movimiento en los tres ejes principales: Difusividad principal (λ_1) representando un coeficiente de difusión aparente (ADC) paralelo a las fibras ($ADC_{//}$); y dos direcciones secundarias (λ_2 y λ_3), representando el coeficiente de difusión aparente perpendicular (ADC_{\perp}), con referencia a la dirección de difusión principal (Tomada de Beaulieu, 6 June 2010. 16th Annual Meeting of the *Organization for Human Brain Mapping. Barcelona*).

1.3 Mapas de difusión

La técnica de DTI permite la reconstrucción anatómica microestructural a través de diferentes mapas, que resultan de la información extraída de las características de difusión (Acosta-Cabronero et al., 2010).

La microestructura celular de la que se compone el tejido cerebral está constituida por diferentes espacios (intracelular, extracelular), de neuronas, células gliales y de axones, por donde las moléculas de agua transcurren. Los **mapas de difusión** representarán imágenes cerebrales que proporcionarán información de la forma, el estado y la integridad de sus estructuras (Beaulieu, 2002). Existen varios tipos de mapas de difusión, que incluyen:

El mapa de **Anisotropía Fraccional (FA)** ha sido el más usado en la mayoría de estudios. Representa los valores de cada vóxel que irá desde un valor de 1 correspondiente a una alta anisotropía hasta 0 que representará baja anisotropía (i.e. isotropía). La naturaleza de difusión en la SB producirá una difusión más rápida a lo largo de los tractos antes que perpendicularmente, porque lo coherente es que la difusión transcurra a lo largo de los axones. Valores altos de FA indican una microestructura neuronal preservada, mientras que el descenso en dichos valores, representará una cierta desorganización tisular, y/o alteraciones neuronales referentes al diámetro o densidad axonal, al volumen de la mielina y, sobre todo, alteraciones en la integridad de membrana axonal (Beaulieu et al., 2002).

El mapa de **Difusión Media (MD)**, describe el movimiento de las moléculas cuando interactúan con las estructuras celulares en un tiempo de difusión dado. El mapa de MD viene marcado por tiempos de difusión cortos y muestra viscosidad intrínseca regional, señalando posibles procesos activos que pueden estar sucediendo en el tejido (e.g. en traumatismo craneoencefálico). Este mapa, como su propio nombre indica, señala la difusividad media y se puede inferir a partir de la conjunción de las dimensiones de difusión a través del elipsoide ($\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 / 3$).

El mapa de **Difusividad Axial (AD)** proporciona un mapa con la información de difusión del *eigenvector* principal (λ_1), es decir, sobre la difusión principal (en el caso de la SB cerebral representa la dirección preferente sobre el eje paralelo a las fibras nerviosas).

Los valores de los *eigenvectors* secundarios al promediarse ($\lambda_2 + \lambda_3 / 2$) representarán la **Difusividad Radial (RD)**, que aporta información sobre los valores de difusión perpendicular a las fibras nerviosas. Los mapas AD i RD, al representar los vectores propios, proporcionan mayor sensibilidad a la hora de interpretar los valores de FA, cuyo valor viene dado por la extracción de una *ratio* de los valores AD, y los valores RD. Cuando disminuye el valor de la FA, puede deberse a cambios en los componentes de AD, que disminuirán (observable por ejemplo, en colapso axonal) o aumento de RD (lo que sucedería en caso de pérdida de mielina o permeabilidad de membrana) (Figura 5).

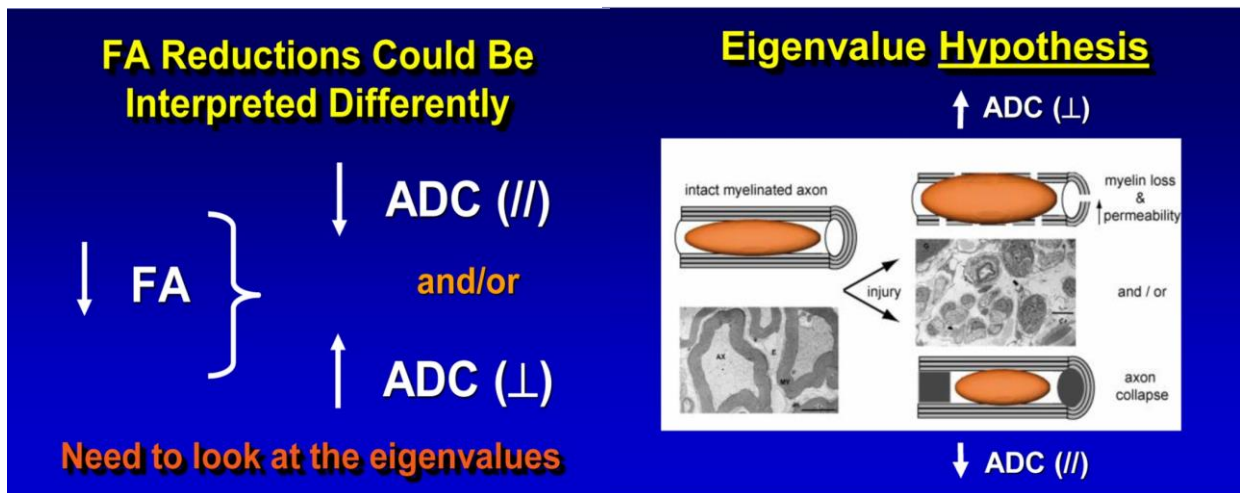


Figura 5. Izquierda: Un descenso en los valores de FA podría interpretarse como un descenso de los valores en la dirección de difusión principal (AD) y/o por un aumento en la difusión perpendicular (RD). Derecha: Ejemplos de descenso de AD en casos de colapso axonal y aumento de RD en casos de pérdida de mielina o permeabilidad de membrana (Tomadas de Beaulieu, 6 June 2010. 16th Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping. Barcelona).

Dichas interpretaciones, debido a su base teórica, deben ser hechas con precaución. Es imprescindible una visión de los mapas en conjunto, sin extraer conclusiones sobre los valores de los mapas de difusión de manera aislada, ya que debe tenerse en cuenta que se trata de medidas indirectas acerca de la microestructura cerebral, de la cual se hacen inferencias (Figura 6). Para una correcta interpretación hay que valorar dichos mapas con una visión global, lo cual permite una mejor comprensión de la situación (Acosta-Cabronero et al., 2010, Wheeler-Kingshott & Cercignani, 2009; Jones et al., 2013).

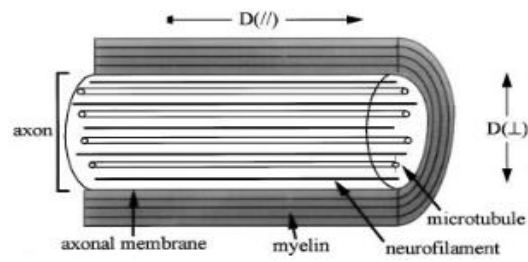


Figura 6. Representación de una fibra axonal compuesta por varias regiones microestructurales, mediante la cual la técnica de DTI realiza inferencias sobre su estado y estructura (extraída de Beaulieu, 2002).

Existen diferentes patologías en las que la SB cerebral puede estar dañada y los mapas de DTI son una herramienta útil para analizar *in vivo* el estado de dicha microestructura.

2. El Síndrome de Cushing (SC)

2.1 Definición, epidemiología y cuadro clínico

El Síndrome de Cushing (SC) es una enfermedad endocrina, causada por una larga exposición a niveles excesivamente altos de la hormona cortisol, produciendo alteraciones físicas y sintomatología psiquiátrica.

El exceso de glucocorticoides (GC) en el SC puede tener una procedencia exógena o endógena. El SC exógeno puede ocurrir de manera secundaria tras tratar afecciones como el asma, la artritis reumatoidea, lupus y otras patologías inflamatorias que requieren tratamientos con base a GC.

El SC de procedencia endógena, es mucho más raro, más prevalente en el género femenino y se produce por un tumor, usualmente benigno. Está catalogada como una enfermedad rara, al ser de muy baja prevalencia. Algunos estudios sitúan la incidencia anual entre el 0.7 y 2.4 por millón de habitantes (Newell-Price et al., 2008). Sin embargo, estas cifras son una probable infraestimación de la prevalencia e incidencias reales por la dificultad de establecer su diagnóstico al asociarse a comorbilidad común como por ejemplo, obesidad de predominio central, diabetes o hipertensión arterial (Guaraldi & Salvatori, 2012). Además, se asocia con osteoporosis, estrías de color púrpura, aparición de equimosis en la piel tras un mínimo golpe, miopatía proximal, irritabilidad y sintomatología psiquiátrica, sobretodo depresión y ansiedad.

(http://www.endocrine.niddk.nih.gov/pubs/cushings/Cushings_Syndrom_508.pdf).

2.2 Etiología y tratamiento

La presencia de un adenoma en el SC endógeno, altera el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) en 3 condiciones distintas:

- La aparición de un adenoma en la hipófisis. Es la condición más común de SC, prevalente en el 70% de los casos (Nieman & Ilias, 2005) y denominada particularmente como Enfermedad de Cushing (EC). En este caso, el tumor hipofisario secreta un exceso de de la Hormona Adenocorticotropa (ACTH) que estimula a las glándulas suprarrenales que liberan un exceso de cortisol, que determina directamente la aparición de la enfermedad (Figura 7).
- La aparición de un adenoma en las glándulas suprarrenales (bilateralmente o tan sólo en una de ellas), hace aumentar los niveles de cortisol causando supresión de los niveles de ACTH. El porcentaje de este tipo de Cushing, denominado ACTH-independiente, se calcula entre un 15% y un 20% de los pacientes con SC (Figura 8).
- Algunos tumores benignos (carcinomas) o no malignos (de pulmón, mama, páncreas, etc.) secretan de forma ectópica ACTH que determina un cuadro clínico similar al de la EC hipofisaria, con hipersecreción de las glándulas suprarrenales. Ésta es la forma menos común de SC, responsable de menos de un 10% de los pacientes (Figura 9).

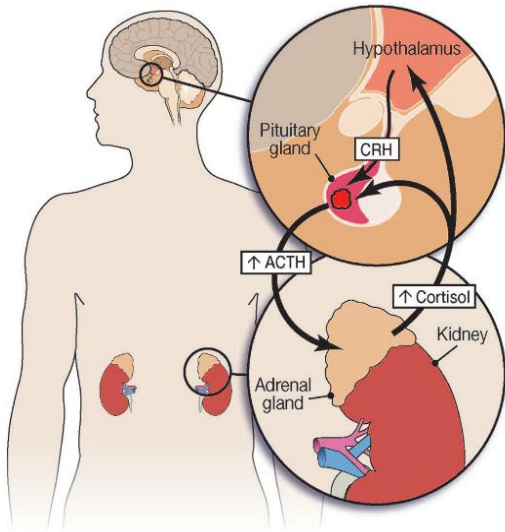


Figura 7. Enfermedad de Cushing (EC): la aparición de un adenoma en la hipófisis hace aumentar los niveles de ACTH que a su vez afectará las glándulas suprarrenales, aumentando los niveles de cortisol (tomada de Guaraldi and Salvatori, 2012).

Figura 8. Síndrome de Cushing ACTH-independiente: el adenoma aparece en las glándulas suprarrenales y aumentan los niveles de cortisol (tomada de Guaraldi and Salvatori, 2012).

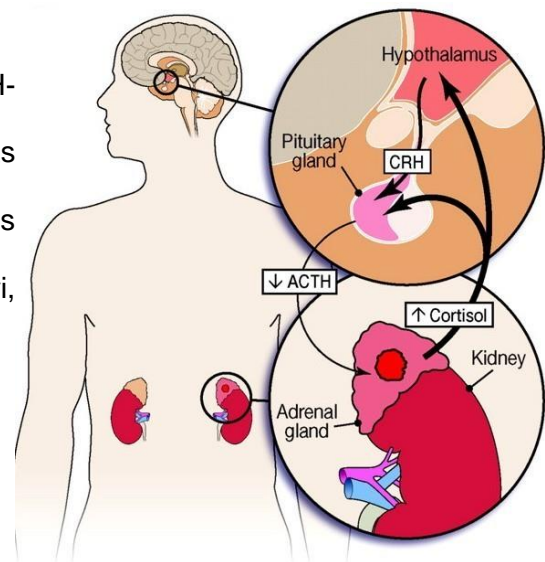
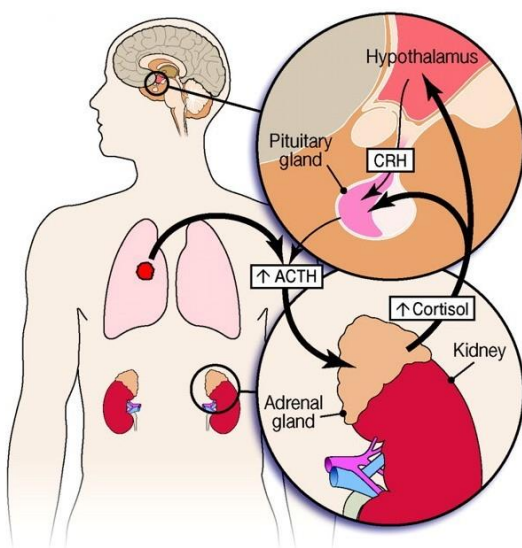


Figura 9. Síndrome de Cushing ectópico, ACTH-dependiente (no pituitario): el adenoma aparece en otro órgano del cuerpo, libera grandes cantidades de ACTH que a su vez hará aumentar la liberación de cortisol en las glándulas suprarrenales (tomada de Guaraldi and Salvatori, 2012).



El tratamiento más habitual, para la EC (forma predominante de manifestarse el SC) es la extirpación del adenoma mediante microcirugía o endoscopia transfenoidal, buscando disminuir los niveles de cortisol. El éxito de la intervención dependerá tanto de las habilidades quirúrgicas como del tamaño y localización del tumor (Hammer et al., 2004), (Rees et al., 2002); sin embargo, en algunos casos puede haber recurrencia (entre un 5-10% en los primeros 5 años y entre un 10-20% 10 años después de la intervención en el caso de los microadenomas con un porcentaje de remisión entre el 65-95%; y <65% en los pacientes con macroadenomas, cuya recurrencia suele avanzarse a los primeros 16-49 meses). En casos de recurrencia es necesario repetir la intervención o someter al paciente a radioterapia, tratamiento médico o adrenalectomía bilateral. Las intervenciones repetidas de cirugía transfenoidal en pacientes recurrentes tienen peor pronóstico en cuanto a eficacia curativa (50-70%) (Mancini et al., 2010).

El hipercortisolismo no tratado, determina mayor morbilidad y mortalidad principalmente por problemas cardiovasculares (Mancini et al., 2004; Arnaldi et al., 2004) y por osteoporosis (Mazziotti et al., 2006; Canalis et al., 2007). Estas complicaciones pueden persistir incluso en pacientes tratados y después de controlar el hipercortisolismo (Arnaldi et al., 2012; Aulinas et al., 2014). El exceso de cortisol también puede producir anomalías cerebrales, psicopatología y alteraciones cognitivas (Herbert et al, 2006; Aulinas et al., 2014).

2.3 Anomalías cerebrales en el Síndrome de Cushing

La exposición crónica a un exceso de GC afecta de forma importante en la función y estructura del SNC (De Kloet et al., 2005). La alta exposición a GC que se da en el SC proporciona un modelo natural para observar los cambios morfológicos que se producen en el cerebro de dichos pacientes, así como las consecuencias psiquiátricas y cognitivas a largo plazo.

A pesar de que los estudios sobre cambios morfológicos cerebrales ocurridos en el SC son limitados, las primeras investigaciones basadas en autopsias, hablan, de cierta pérdida de volumen cerebral y de un alargamiento ventricular en algunos pacientes, que se relacionan con la pérdida de peso cerebral (Trethowan & Cobb, 1952; Cope & Raker, 1955). Las primeras técnicas de neuroimagen, mediante neumoencefalografía, describieron una alta incidencia de atrofia cerebral y cerebelar en la EC (Momose et al., 1971). El hipocampo es una estructura especialmente vulnerable al exceso de cortisol por su riqueza en receptores de GC. Mediante otras técnicas de neuroimagen, como es la suma digital, se ha descrito así también, una disminución del volumen hipocampal asociado a disfunción de la memoria y elevados niveles de cortisol en pacientes con SC (Starkman et al,1992).

Estudios más recientes han descrito atrofia cerebral mediante observaciones subjetivas de MRI y tomografía axial computarizada (TAC) en pacientes con EC en comparación a una muestra apareada de controles sanos (Simmons et al., 2000). Otros autores han encontrado valores subjetivos de pérdida de volumen cerebral e incrementos del diámetro del tercer ventrículo y bicaudado usando MRI y TAC en pacientes con SC, lo

que aporta una nueva evidencia acerca de la existencia de una pérdida del volumen cerebral en SC (Bourdeau et al., 2002). No obstante, dichos autores no encontraron correlaciones entre la pérdida del volumen cerebral y la concentración de cortisol en orina 24 horas. Estas alteraciones parecían revertir tras la normalización del cortisol, aunque sin llegar a los valores del grupo control sano.

Otros estudios con pacientes con SC describen una pérdida de volumen cerebral, que refleja atrofia o pérdida celular (Bourdeau et al., 2005). Starkman y colaboradores (1999), relata un incremento de los volúmenes del hipocampo en pacientes con SC tratados, que se correlaciona con la reducción de la concentración de cortisol en orina. Estos mismos autores hallaron una tendencia en la reversibilidad de estas alteraciones en el núcleo caudado, aún sin llegar a normalizarse.

También se han hallado alteraciones en los niveles de metabolitos en un estudio con espectroscopía, que reveló decrementos en los ratios de colina/creatina (Cho/Cr), un marcador de la integridad de las membranas celulares, en áreas frontales y talámicas, sin hallar variaciones en áreas temporales, ni otras alteraciones en el resto de los metabolitos (Khiat et al., 1999). Los niveles de Cho, posteriormente, revirtieron en las áreas frontales y talámicas después de la corrección del hipercortisolismo (Khiat et al., 2000).

Estudios recientes usando una metodología de neuroimagen más avanzada y llevados a cabo por nuestro grupo, halló una disminución de los volúmenes hipocampales medidos con MRI 3-Tesla en aquellos pacientes con SC que tenían un peor rendimiento en tareas

cognitivas de memoria verbal y visual (Resmini et al., 2012). En un estudio más reciente, hallamos alteraciones en los niveles de metabolitos localizados en las áreas hipocampales de pacientes con SC curado, concretamente una disminución del N-acetil-aspartato (NAA), lo que sugiere una disfunción/pérdida neuronal, así como aumentos de Glutamato + Glutamina (Glx), que indican una posible proliferación glial como mecanismo de reparación neuronal (Resmini et al., 2013).

En contraste con la evidencia de hallazgos estructurales en MRI en el cerebro de pacientes con EC, no se han descrito apenas, hasta el momento, alteraciones funcionales en MRI en el SC (Andela et al., 2015). No tenemos constancia hasta el momento más que de un único estudio de DTI, coetáneo al nuestro, en el que se hallaron algunas anomalías en la integridad de la SB con disminución de la FA. También se describían en este único estudio, correlaciones entre la severidad de la sintomatología depresiva y la integridad de la SB en el fascículo uncinado (UF). Dicho estudio evaluó pacientes con EC en remisión a largo plazo de hipercortisolismo (van der Werff 2014), por lo que los efectos nocivos en la SB en otras condiciones clínicas del SC (como hipercortisolismo activo) son, hasta ahora, desconocidos (Andela et al., 2015).

2.4 Afectación psiquiátrica y cognitiva en el Síndrome de Cushing

Además de las alteraciones previamente descritas, una exposición prolongada a niveles altos de GC puede acarrear en el SC otras complicaciones de tipo cognitivo y psiquiátrico (Hatipoglu et al., 2012; Bourdeau et al., 2005).

La presencia de psicopatología en el SC fue originalmente descrita por el Dr. Cushing en 1932 (Starr, 1952). Posteriormente, otros estudios lo han corroborado, siendo la depresión el trastorno psiquiátrico de mayor incidencia (Starkman et al., 1981; Sonino et al., 1998). Los síntomas propios de un Trastorno Depresivo Mayor (TDM) son habituales en más del 50% de los pacientes con SC (Kelly, 1996; Sonino et al., 1993), llegando en algunos casos a ser severo (Whitlock, 1982; Haskett, 1985).

Curiosamente, los inhibidores de la producción de corticosteroides como el Ketoconazol (Ktz) y la Metopirona (Mtp), más que los fármacos antidepresivos, son útiles para aliviar la sintomatología depresiva en el SC (Pereira et al., 2010; Sonino & Fava, 2001), de lo que se infiere que los niveles de cortisol elevado juegan un papel importante en estas consecuencias de la enfermedad. Otros trastornos psicopatológicos, aunque menos incidentes que el TDM, coexisten en el SC, como es el caso del trastorno de ansiedad y en menor proporción la manía. De esta manera, depresión y ansiedad son las psicopatologías más comunes (Sonino & Fava, 2001) y algunos autores describen un síndrome ansioso-depresivo en pacientes con SC (Loosen et al., 1992). Hallan criterios de ansiedad generalizada en un 79% de los casos y de trastorno de pánico en un 53%. Sin embargo, la comorbilidad del trastorno de ansiedad es habitual en pacientes depresivos que no tienen alteraciones endocrinas (Fava et al., 2000), por lo que es difícil establecer si la ansiedad de los pacientes con SC, es propia de la enfermedad o como consecuencia de la depresión.

Tal y como sucede en los estudios de morfología cerebral, en los que se encuentra tan solo una recuperación parcial después de la corrección del hipercortisolismo sin llegar a

normalizarse, la sintomatología psiquiátrica también perdura en pacientes con SC curado (Sonino et al., 2004; Sonino & Fava, 2001; Sonino et al., 2007; Dorn et al., 1997), posiblemente como consecuencia de la larga exposición a altos niveles de GC a lo largo de la enfermedad.

Se han encontrado, además, correlaciones entre la sintomatología afectiva y daños cognitivos en el SC (Starkman et al., 1986). En los últimos años han surgido estudios que han relacionado daños cognitivos con los efectos de los GC; sin embargo, estos estudios cognitivos en el SC, son escasos (Bourdeau et al., 2005).

Starkman y colaboradores (1992) encontraron correlaciones significativas entre la severidad del hipercortisolismo, el grado de atrofia hipocámpal y déficits en aprendizaje verbal y de memoria en pacientes con SC. Los resultados de un estudio posterior, mostraron que los volúmenes hipocámpales aumentados en los pacientes con SC curado se relacionaban con la mejora cognitiva referente al aprendizaje verbal (Starkman et al., 2003).

A pesar de que la memoria es la función más estudiada en el SC debido a la gran cantidad de receptores de GC localizados en el hipocampo, también existe una amplia distribución de receptores de GC en otras áreas del encéfalo como el córtex cerebral, lo que implicaría a otras funciones cognitivas (Bourdeau et al., 2005). Se han encontrado déficits de la información visual y espacial, razonamiento y formación de conceptos, así como en el rendimiento verbal y el lenguaje, después de la exposición crónica a niveles de GC elevados en pacientes con SC, en comparación con controles sanos y apareados

(Forget et al., 2000). Estos resultados coinciden con los hallazgos de Starkman et al., (2001) que encontraron que los altos niveles de hipercortisolemia crónica causada por el SC, afectaban diferentes dominios de la función cognitiva, incluyendo las competencias verbales, visuoespaciales, aprendizaje y memoria. Otro estudio confirmó un moderado daño cognitivo en pacientes con EC en comparación con sus controles; con déficits en el test del Symbol Digit Modalities Test (SDMT, extraído de Wechsler Adult Intelligence Scales [WAIS]), que puede indicar un daño en atención y funciones visuomotoras (Mauri et al., 1993). Dichas alteraciones podrían representar algún problema subyacente en la estructura de la SB cerebral, al ser el principal medio de comunicación interneuronal. En este sentido, Whelan et al. (1980) ya sugirió que los pacientes con SC presentaban un mayor patrón de déficits neuropsicológicos en funciones de la memoria visual-ideacional y visuales no verbales en comparación con los controles. Los autores, asociaron este patrón de déficits cognitivos en el SC al de los pacientes con patología bilateral difusa como ocurre en neurotoxicidad, anoxia, y trastornos neurológicos infecciosos.

Algunos estudios que examinaron el estado cognitivo de los pacientes con SC una vez tratados, no mostraban reversibilidad (Dorn & Cerrone, 2000) o mostraban cierta reversibilidad aunque no en todas las áreas cognitivas (Mauri et al., 1993; Martignoni et al., 1992; Forget et al., 2002). Utilizando un enfoque cualitativo, un 66% de los pacientes tratados con SC aún presentaba déficits de las áreas físicas, cognitivas y afectivas (Gotch, 1994).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis:

El SC es una enfermedad que permite estudiar el efecto tóxico del hipercortisolismo crónico endógeno, ya sea por efecto directo del exceso de cortisol o por los efectos secundarios que éste determina.

Hay estudios previos que muestran alteraciones cerebrales en el SC, pero la mayoría se han centrado en la pérdida de volumen, y principalmente en la estructura del hipocampo. Algunas de estas investigaciones muestran cierta reversibilidad después de la corrección del hipercortisolismo, pero sin llegar a normalizarse. Las recientes técnicas de neuroimagen han mostrado alteraciones metabólicas en pacientes con SC curado, relevantes en la funcionalidad de los compartimentos celulares neuronal y glial, señalando así la posibilidad de que existan alteraciones microestructurales en la SB de pacientes con SC. Por lo tanto, la SB cerebral en el SC, podría estar dañada y a su vez, esto podría relacionarse con las alteraciones cognitivas y psiquiátricas presentes en estos pacientes.

Las hipótesis que nos planteamos son las siguientes:

Hipótesis I

Los pacientes con SC presentan alteraciones en la SB cerebral en comparación con los controles sanos, que podrían detectarse en los mapas de DTI.

Hipótesis II

Las alteraciones en la SB cerebral están presentes en pacientes con SC activo pero podrían persistir tras revertir el hipercortisolismo, sea tras tratamiento médico o cirugía curativa.

Hipótesis III

Las alteraciones en la SB podrían estar relacionadas con la duración de la enfermedad (tiempo de exposición al hipercortisolismo), más que con el cortisol en un momento puntual (cortisol en orina 24 horas).

Hipótesis IV

Los pacientes con SC presentarán mayor sintomatología psiquiátrica (depresión y ansiedad) y menor rendimiento cognitivo (velocidad de procesamiento de la información) con respecto a los controles.

Hipótesis V

Las puntuaciones de las pruebas psiquiátricas y cognitivas estarían relacionadas con el estado de la SB cerebral.

2. Objetivos:

El objetivo general de esta tesis es investigar el estado de la SB cerebral en el SC en comparación con sujetos sanos, su relación con el hipercortisolismo endógeno y su implicación en la sintomatología psiquiátrica (principalmente, depresión y ansiedad) y en el rendimiento cognitivo.

Específicamente se plantean los siguientes objetivos:

- 1) Investigar el estado microestructural de la SB mediante DTI (mapas FA, MD, AD y RD) en pacientes con SC (tanto con hipercortisolismo activo, como en pacientes con hipercortisolismo controlado por medicación y en pacientes curados tras cirugía), comparando los 3 grupos entre sí y con un grupo control de sujetos sanos apareados.
- 2) Evaluar si los factores de riesgo cardiovascular presentes en cada grupo se correlacionan con los resultados de DTI y los diferentes mapas estudiados (FA, MD, AD y RD).
- 3) Investigar si el estado de la microestructura de la SB (evaluado con mapas FA, MD, AD y RD) se relaciona con la duración de exposición al hipercortisolismo (duración de la enfermedad) y con el cortisol en el momento puntual del estudio (evaluado mediante el cortisol en orina de 24 horas), tanto en pacientes con SC como en el grupo control.

4) Evaluar si el estado de la microestructura de la SB (evaluado con mapas FA, MD, AD y RD) se relaciona con la evaluación neuropsiquiátrica (depresión y ansiedad), en pacientes con SC y en el grupo control.

5) Investigar si el estado de la microestructura de la SB (evaluado con mapas FA, MD, AD y RD) se relaciona con el rendimiento cognitivo evaluado mediante una prueba de velocidad de procesamiento de la información, en pacientes con SC y en el grupo control.

MÉTODOS

1. Sujetos

La muestra del estudio está formada por pacientes procedentes del Hospital de Sant Pau en la provincia de Barcelona. Todos los participantes, tanto pacientes como controles, realizaron voluntariamente el estudio y firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité Ético del Hospital.

La muestra se compuso por 35 pacientes con SC y 35 controles sanos apareados por edad, sexo y nivel educativo (± 3 años).

Se incluyeron pacientes diagnosticados de SC de los cuales 8 tenían un SC activo, con hipercortisolismo (definido por concentración elevada en orina de 24 horas) en el momento del análisis. Siete de los pacientes con SC activo eran de nuevo diagnóstico mientras que 1 era recurrente tras cirugía previa. Dos de ellos estaban tratándose con Mtp, 1 con Ktz, 1 con cabergolina y 4 de ellos no estaban tratados.

Siete pacientes pertenecían al grupo de pacientes con SC controlado al estar medicados y presentar niveles normalizados de cortisol (en orina de 24 horas): 3 sujetos mediante Ktz, 2 con Mtp, 1 con Mtp y Ktz y 1 con cabergolina. Seis de los controlados eran de nuevo diagnóstico mientras que 1 había sufrido una recurrencia tras cirugía previa.

El tercer grupo se componía de 20 pacientes con SC tratado tras cirugía, después de haber sido sometidos a cirugía estaban eucortisolémicos: 13 presentaban concentración

normalizada en orina de 24 horas y los otros 7 tenían insuficiencia adrenal tras cirugía, 5 de los cuales requerían terapia de sustitución con hidrocortisona.

El SC se consideró en remisión si los pacientes estaban en insuficiencia adrenal o tenían una supresión de cortisol matinal (<50 nmol/l; <1.8 μ g/dl) tras 1mg de dexametasona a las 23h, y/o concentración de cortisol en orina de 24 horas (medido con un RIA comercial después de una extracción previa con un disolvente orgánico; normal <280 nmol/24 horas).

Se recogieron los datos de edad, género, años de educación, tabaquismo, orina 24 horas, duración de la enfermedad y etiología, así como otras variables clínicas relacionadas con factores de riesgo cardiovascular: hipertensión, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, obesidad e índice de masa corporal (IMC).

El tiempo de duración de la enfermedad se consideró desde la aparición de los síntomas según refería el paciente hasta la remisión del hipercortisolismo después del tratamiento y fue evaluado por el endocrinólogo a cargo. En el momento del diagnóstico, la duración del hipercortisolismo se estimó tras una entrevista personal y detallada, mediante la revisión de la historia clínica y fotografías proporcionadas por los pacientes. Toda la información fue recogida en registros clínicos junto con los datos relativos a los parámetros bioquímicos. Los sujetos con diabetes mellitus fueron excluidos de la muestra al ser una enfermedad que de por sí presenta alteraciones en la microestructura de la SB (Hsu et al., 2012). Todos los sujetos eran diestros. Ninguno había sufrido una lesión cerebral ni cerebrovascular. Los controles sanos no padecían ni presentaban antecedentes de enfermedad psiquiátrica.

2. Adquisición y procesamiento de las imágenes

2.1 Adquisición de las imágenes MRI

Las MRI se adquirieron en un aparato de 3T (Philips Achieva, v. 2.1.3.2) en el Servicio de Radiodiagnóstico del Hospital de Sant Pau, utilizando el mismo protocolo de adquisición dedicado, que incluye secuencias de DTI, T1, FLAIR y espectroscopía para todos los participantes. Las secuencias de DTI utilizadas para los análisis fueron adquiridas utilizando los siguientes parámetros: adquisición SENSE de disparo único en imágenes eco-planar (EPI) TE=60 ms, TR=8166 ms, grosor del corte=2 mm, dimensiones del vóxel=1.75x1.75x2 mm, *field of view* (FOV)=100 mm, dimensiones de imagen=128x128x60, matriz de adquisición=112, número de cortes=1.020, 15 orientaciones (*eigenvectors*) de gradiente y valores (*eigenvalues*) de 0 s/mm² (B0) para el primer volumen sin difusión ponderada y de 800 s/mm² para el resto de volúmenes.

2.2 Procesamiento de las imágenes de DTI

Los archivos correspondientes a los cortes adquiridos de DTI, que originariamente se adquirieron en formato Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM), fueron convertidos a formato Neuroimaging Informatics Technology Initiative (NIfTI) mediante el programa mrico creado por Chris Roden (<http://www.mccauslandcenter.sc.edu/mrico/>) para poder ser posteriormente procesadas.

El procesamiento de las imágenes de DTI se realizó en el grupo de Neurorradiología del IIB-SantPau/Imagen Médica del Port d'Informació Científica (PIC) en Barcelona, a través

del llamado portal web PICNIC (<https://neuroweb.pic.es>) en el que se incorporan las principales herramientas utilizadas del software FSL v4.1.4 (FMRIB Software Library) desarrollado por Smith et al., 2004. Las imágenes de difusión en formato 4D se alinearon por posibles movimientos de cabeza por parte del sujeto y para corregir las corrientes de Foucault, mediante un registro afín, con la herramienta Eddy Current Correction.

El primer volumen con los parámetros B0 se extrajo como imagen de referencia utilizando la herramienta BET (Brain Extraction Tool) (Smith, 2002) para la creación de una máscara binaria, adaptada al tamaño cerebral de cada sujeto.

Posteriormente, se utilizó el volumen 4D corregido de cada sujeto, la imagen de la máscara cerebral y los valores de las direcciones e intensidad de gradiente para generar los mapas las imágenes de FA, MD, AD y RD. Dichos mapas se procesaron mediante la herramienta DTIFIT del paquete FMRIB Diffusion Toolbox (FDT), ajustando los tensores de difusión apropiados para cada vóxel.

A continuación, se utilizó el paquete Tract-based Spatial Statistics (TBSS) (Smith et al., 2006) que genera un registro no lineal (FNIRT) de las imágenes FA con el fin de ajustarlas a un espacio estándar: la imagen FMRIB58-FA. Posteriormente se generó una media de todas las imágenes FA registradas para crear una imagen del esqueleto con los principales tractos de SB. A continuación se generó una imagen media de los esqueletos y se excluyeron los valores de vóxel inferiores a 0.2, aumentando así la consistencia del análisis.

El resto de los mapas de difusión (MD, AD y RD) siguieron el mismo protocolo TBSS mediante la estimación de sus propios vectores.

3. Exploración psiquiátrica y cognitiva

Los participantes fueron examinados de los siguientes dominios neuropsiquiátricos y cognitivos:

3.1 Sintomatología Depresiva

Se evaluó mediante el **Beck Depression Inventory (BDI-II)** (Beck et al., 1961), un cuestionario autoadministrado compuesto por 21 ítems para medir las actitudes, los síntomas y los sentimientos de depresión de las últimas dos semanas. Los ítems se refieren a características depresivas como la pérdida de energía, cambios en los patrones de sueño, irritabilidad, cambios en el apetito, dificultades de concentración, cansancio y/o fatiga y pérdida de interés en el sexo. Cada pregunta contiene cuatro alternativas de respuesta, dispuestas de menor a mayor gravedad de los síntomas depresivos. La puntuación total se clasifica en 4 niveles de depresión que van desde un estado considerado como normal (0-13), pasando por una alteración leve del estado de ánimo (14-19), depresión moderada (20-28), hasta llegar a puntuaciones de depresión extrema (> 40).

3.2 Sintomatología Ansiosa

Se evaluó mediante **The State-Trait Anxiety Inventory (STAI)**, una prueba autoadministrada que mide la presencia y la gravedad de la ansiedad. Se compone de 2 subescalas: la *Escala de Ansiedad Estado (E-Ansiedad)* con 20 ítems que evalúan la presencia y la intensidad de los síntomas de ansiedad actuales (en el mismo momento de la administración del test) y la *Escala de Ansiedad Rasgo (R- Ansiedad)*, que incluye 20 ítems relacionados con la presencia de la ansiedad como rasgo general de la persona. Los resultados indican si existe presencia de ansiedad y con qué frecuencia se presenta. Las puntuaciones totales van de 0 a 60, distribuyendo cada pregunta en una escala de 0 a 3 puntos que varían desde ausencia de ansiedad, pasando por leve, moderada hasta llegar al estado de máxima ansiedad. Las puntuaciones totales más altas se relacionan con mayor ansiedad.

3.3 Velocidad de Procesamiento de la Información

Se analizó con **The Symbol Digit Modalities Test (SDMT)**, una prueba de atención sostenida que además evalúa la velocidad de procesamiento de la información. Consiste en sustituir una serie de números en lugar de sus símbolos correspondientes respondiendo tan rápidamente como sea posible en un rango de 90 segundos (Figura 10). Se evalúa el total de los símbolos sustituidos correctamente en estos 90 segundos, tomando este valor como una medida de la velocidad de procesamiento de la información de cada sujeto. La forma oral (oSDMT) llevada a cabo en el presente estudio, permite eliminar el efecto motor implicado en la versión escrita (eSDMT). Todos los participantes fueron examinados por la misma neuropsicóloga entrenada.

KEY								
(-	┌	Γ	┐	>	+)	÷
1	2	3	4	5	6	7	8	9

(┐	-	(┌	>	-	Γ	(>	-	(>	(-

Figure 1 - Key sequence and first line of the Symbol Digit Modalities Test.

Sample material from the SDMT copyright © 1973 by Western Psychological Services. Reprinted by permission of the publisher, Western Psychological Services, 12031 Wilshire Boulevard, Los Angeles, California, 90025, USA, www.wpspublish.com. Not to be reprinted in whole or in part for any additional purpose without the expressed, written permission of the publisher. All rights reserved.

Figura 10. Secuencia de símbolos con sus correspondientes números y primera línea de la prueba Symbol Digits Modalities Test (SDMT). Extraída de http://www.functionalneurology.com/materiale_cic/131_XXI_2/1181_The%20Symbol/index.html

4. Análisis estadístico

4.1 Análisis estadístico de las variables demográficas, clínicas, neuropsiquiátricas y cognitivas

Se utilizó el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v.20) para realizar el análisis estadístico de las variables demográficas, clínicas, neuropsiquiátricas y cognitivas. Se aplicó al análisis de las variables cuantitativas, una prueba t de Student para muestras independientes (pacientes con SC *versus* controles sanos) o ANOVA para el análisis multigrupal (pacientes con SC activo *versus* SC controlado *versus* SC curado *versus* sujetos controles sanos) utilizando una prueba *post-*

hoc de Tukey. Se aplicó la prueba χ^2 para el análisis de variables categóricas. El nivel de significación estadística fue establecido en un valor de $p < 0.05$.

Para las correlaciones gráficas entre los valores significativos de los mapas de DTI con respecto a los resultados de la prueba de depresión Beck y los de la prueba SDMT, se aplicaron regresiones lineales.

4.2 Análisis estadístico de los datos de DTI

Se realizó un análisis vóxel a vóxel en todo el cerebro con la herramienta randomise (incluida en FSL 4.1.4) (Nichols & Holmes, 2002) y se utilizó un Modelo General Lineal (GLM).

Específicamente para el análisis **pacientes con SC versus controles**, se aplicó un diseño de 2 grupos y se compararon los valores superiores (>) e inferiores (<) en cada uno de los mapas de DTI (FA, MD, AD y RD) bajo 2 contrastes:

1- Controles sanos > Pacientes con SC

2- Controles sanos < Pacientes con SC

En el siguiente análisis, se aplicó un diseño con 4 grupos (**SC activo, SC controlado, SC curado y controles sanos**) y se compararon los valores superiores (>) e inferiores (<) en cada uno de los mapas de DTI (FA, MD, AD y RD) bajo 12 contrastes:

- 1- Controles sanos > SC controlado**
- 2- Controles sanos < SC controlado**
- 3- Controles sanos > SC activo**
- 4- Controles sanos < SC activo**
- 5- Controles sanos > SC curado**
- 6- Controles sanos < SC curado**
- 7- SC controlado > SC activo**
- 8- SC controlado < SC activo**
- 9- SC controlado > SC curado**
- 10- SC controlado < SC curado**
- 11- SC activo > SC curado**
- 12- SC activo < SC curado**

Para ambos análisis, las variables clínicas que difirieron significativamente entre los grupos (hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal) se incluyeron como covariables eliminando así el impacto de dichas variables sobre la SB.

Las imágenes con los tractos de FA eskeletonizadas de cada sujeto se proyectaron en la imagen media eskeletonizada realizando 5000 permutaciones. La diferencia entre resultados se estableció con un nivel de significación $p < 0.05$, corregido mediante Family Wise Error (FWE) utilizando la metodología Threshold-Free Cluster Enhancement (TFCE), método de alta sensibilidad (Smith & Nichols, 2009). Para todos los mapas de DTI, se siguió la misma metodología estadística.

Para los análisis de las correlaciones se utilizaron los mapas de DTI (FA, MD, AD y RD) en relación con la concentración de cortisol en orina 24 horas, duración de la enfermedad, los resultados de la prueba de depresión Beck, los de la prueba de ansiedad STAI (rasgo y estado) y los de la prueba SDMT de velocidad de procesamiento de la información. La diferencia entre los resultados se identificó por un valor $p < 0.05$, corregido por FWE y metodología TFCE.

RESULTADOS

1. Análisis 1. Diferencias en el conjunto de pacientes con SC y controles

1.1 Diferencias demográficas y clínicas

Los resultados del análisis de las variables demográficas muestran que no hay diferencias significativas entre los grupos, al tratarse de una muestra apareada respecto a la edad, género y años de educación (± 3 años). Por lo tanto, los dos grupos son homogéneos respecto a dichas variables.

Las variables clínicas entre grupos difieren en hipertensión arterial (0 controles frente a 15 pacientes con SC; $p < 0.001$), hipertrigliceridemia (6 controles frente a 17 pacientes con SC; $p = 0.004$), obesidad central (10 controles frente a 24 pacientes con SC; $p < 0.001$) y el índice de masa corporal (controles: 22 normal, 11 con sobrepeso y 2 obesos frente a pacientes con SC: 11 normal, 17 con sobrepeso y 7 obesos; $p = 0.019$). Estas variables que diferían significativamente, se utilizaron como covariables en el análisis comparativo de DTI. En cuanto a la condición de fumador, no se encontraron diferencias entre grupos (controles: 12 no fumadores, 12 fumadores y 11 ex fumadores frente a pacientes con SC: 18 fumadores, 10 fumadores y 7 ex fumadores; $p = 0.319$). Tampoco se encontraron diferencias significativas en hipercolesterolemia (4 controles con hipercolesterolemia frente a 4 pacientes con SC con hipercolesterolemia; $p = 1$).

1.2 Diferencias en los mapas de DTI

Los resultados de los análisis de DTI mostraron que el grupo de pacientes con SC

presentaba una reducción (<) en los valores de FA y un aumento (>) de MD, AD y RD con respecto al grupo control, aún incluyendo en el análisis las covariables hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal (Figura 11).

FA: pacientes con SC < controles: Los valores de FA de todos los pacientes con SC fueron menores en comparación con los controles, con una diferencia máxima localizada en el lado derecho del *fórcex menor*, tanto en el lóbulo frontal, como también extendiéndose sobre otras áreas del cerebro localizadas en los lóbulos frontal, parietal, temporal, occipital y en el cerebelo (Figura 11A).

No se encontraron resultados significativos de los valores de FA en el contraste inverso (pacientes con SC > controles).

MD: pacientes con SC > controles: Los valores de MD de todos los pacientes con SC fueron mayores en comparación con los controles, con una diferencia máxima localizada en el *fascículo longitudinal inferior (ILF)* izquierdo del lóbulo parietal. El aumento de los valores de MD en los pacientes con SC, también se extendían sobre los lóbulos parietales, temporales, frontales, occipitales y cerebelo (Figura 11B).

No se encontraron resultados significativos de los valores de MD en el contraste inverso (pacientes con SC < controles).

AD: pacientes con SC > controles: Los valores de AD de todos los pacientes con SC fueron mayores en comparación con los controles sanos, con una diferencia máxima localizada en el *fascículo longitudinal superior (SLF)* izquierdo, pero también sobre la *circunvolución cingulada posterior derecha*, el *cíngulo posterior derecho del hipocampo*, el

fórceps mayor (localizado en el lóbulo occipital), *el fascículo fronto-occipital inferior (IFOF) izquierdo, el ILF izquierdo y el SLF derecho* (Figura 11C).

No se encontraron resultados significativos de los valores de AD en el contraste inverso (pacientes con SC < controles).

RD: pacientes con SC > controles: Los valores de RD de todos los pacientes con SC fueron mayores que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *córtex medial frontal derecho*, zona adyacente al *fórceps menor*, pero también mostrando un aumento en otras áreas de los lóbulos frontal, temporal, parietal y occipital y en el cerebro (Figura 11D).

No se encontraron resultados significativos de los valores de RD en el contraste inverso (pacientes con SC < controles).

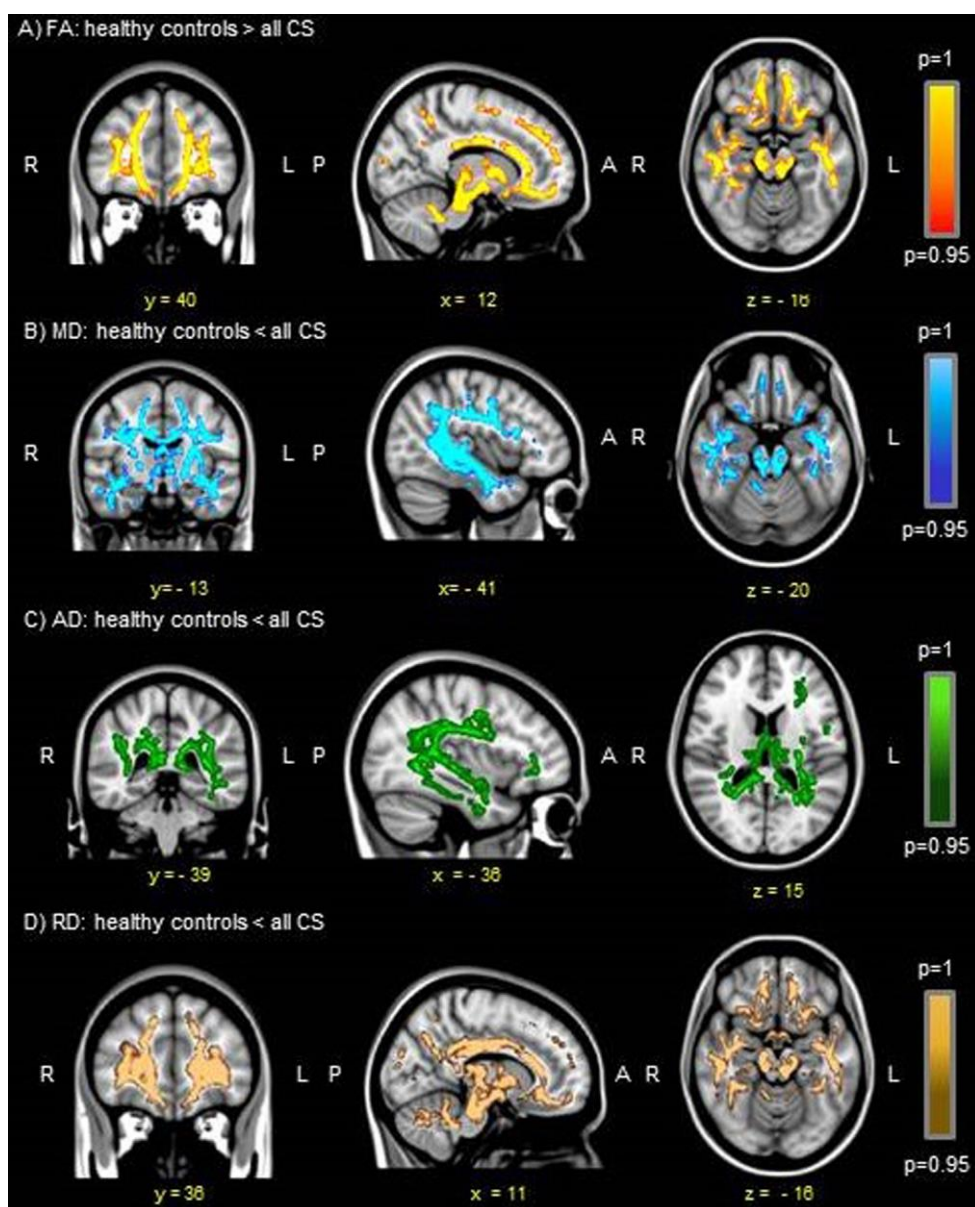


Figura 11. Diferencias de los mapas DTI comparando todos los pacientes con SC frente a controles incluyendo como covariables la hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal. Los vóxeles resaltados con colores rojo y amarillo representan las regiones en las que la FA fue menor (A), los vóxeles resaltados con colores azul y azul claro representan los valores de MD aumentados (B), los vóxeles representados con color verde y verde claro representan aumentos de AD (C) y los vóxeles representado por colores marrón y marrón claro muestran los aumentos de RD (D) en todos los pacientes con SC respecto a los controles. Las imágenes de izquierda a derecha muestran los cortes de planos coronal, sagital y axial en las coordenadas de máxima diferencia sobre una imagen estándar MNI152 a un nivel de significación $p < 0.05$ sobre el atlas JHU white-matter tractography, incluido en el programa FSL. R: derecha. L: izquierdo. A: anterior. P: posterior.

2. Análisis 2. Diferencias entre SC activo, SC controlado, SC curado y controles

2.1 Diferencias demográficas y clínicas

Los resultados del análisis de las variables demográficas muestran que no hay diferencias significativas entre los grupos respecto a la edad, género y años de educación. De esta manera, los 4 grupos son homogéneos respecto a estas variables.

En cuanto a las variables clínicas, la concentración de cortisol en orina de 24 horas de los pacientes con SC activo fueron efectivamente superiores a los otros 3 grupos. Los datos sobre hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal diferían entre grupos. No se encontraron diferencias entre grupos en la condición de fumador ni en presencia de hipercolesterolemia. En los grupos de pacientes con SC no se encontraron diferencias en la duración de la enfermedad ni en la etiología. Todos estos resultados se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de las comparaciones entre grupos respecto a las variables demográficas y clínicas.

	Controles	SC Activo	SC Controlado	SC Curado	F/ χ^2	Valor de p
Edad	42.3 ± 10.4	41.9 ± 8.7	47.1 ± 10.0	41.4 ± 10.0	5.9	NS
Género (H/M)	6/29	1/7	1/6	4/16	0.3	NS
Años de educación	13.5 ± 3.4	14.4 ± 3.0	12.9 ± 2.3	13.4 ± 3.1	0.3	NS
Cortisol Orina 24 horas (nmol/d)	133 ± 52	543 ± 307	152 ± 74	122 ± 75	26.3	<0.001 (1)
Condición de fumador (no/sí/ex-fumador)	12/12/11	7/1/0	2/4/1	9/5/6	10.4	NS
Duración de la enfermedad (meses)	NA	77.6 ± 77.4	44.6 ± 21.9	64.6 ± 34.0	0.99	NS
Etiología (Hipofisaria/Suprarrenal/Ectópico/AIMAH)	NA	5/3/0/0	3/2/1/1	17/2/0/0	10.8	NS
Hipertensión (no/sí)	35/0	4/4	3/4	13/7	20.9	<0.001 (2)
Hipercolesterolemia (no/sí)	31/4	7/1	7/0	17/3	1.2	NS
Hipertrigliceridemia (no/sí)	29/6	6/2	3/4	9/11	10.5	0.015 (3)
Obesidad Central (no/sí)	25/10	2/6	0/7	9/11	15.6	0.001 (4)
Índice de Masa Corporal (no/sobrepeso/obesidad)	22/11/2	2/5/1	1/3/3	8/9/3	12.6	0.049 (5)

(1) Controles vs SC Activo (<0.001); SC Activo vs SC Controlado CS (<0.001); SC Activo vs SC Curado (<0.001); Controles vs SC Controlado (NS); Controles vs SC Curado (NS); SC Controlado vs SC Curado (NS).

(2) Controles vs SC Activos (<0.001); SC Activos vs SC Controlado (NS); SC Activo vs SC Curado (NS); Controles vs SC Controlado (<0.001); Controles vs SC Curado (<0.001); SC Controlado vs SC Curado (NS).

(3) Controles vs SC Activo (NS); SC Activo vs SC Controlado (NS); SC Activo vs SC Curado (NS); Controles vs SC Controlado (0.043); Controles vs SC Curado (0.006); SC Controlado vs SC Curado (NS).

(4) Controles vs SC Activo ($p=0.015$); SC Activo vs SC Controlado (NS); SC Activo vs SC Curado (NS); Controles vs SC Controlados (0.001); Controles vs SC Curados (NS); SC Controlados vs SC Curados (NS).

(5) Controles vs SC Activo (NS); SC Activo vs SC Controlado (NS); SC Activo vs SC Curado (NS); Controles vs SC Controlado (0.015); Controles vs SC Curado (NS); SC Controlados vs SC Curado (NS).

Los valores están expresados en Media ± Desviación Típica (DT)

NS: No Significativo

AIMAH: ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia

Índice de Masa Corporal: normal ≤ 25 , sobrepeso 25-30, obesidad > 30

2.2 Diferencias en los mapas de DTI

2.2.1 SC Activo versus Controles

Como se muestra en la figura 12, existen diferencias entre los grupos de SC activo y controles con respecto a los mapas de DTI, aún incluyendo en el análisis las covariables hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal:

FA: SC activo < controles: Los valores de FA fueron menores en los pacientes con SC activo que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *fórcex menor* del lóbulo frontal izquierdo. También hubo diferencias en algunos vóxeles del *tracto corticoespinal (CST)* izquierdo, *cuerpo calloso*, *IFOF* bilateral en las regiones frontales, *fórcex menor* y *fórcex mayor* del hemisferio derecho (Figura 12A).

No se encontraron resultados significativos de los valores de FA en el contraste inverso (SC activo > controles).

MD: SC activo > controles: Los valores de MD fueron mayores en los pacientes con SC activo que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *fórcex mayor* del lóbulo occipital derecho y ampliamente distribuido a través de otras regiones de los *lóbulos frontal, parietal, occipital, temporal y cerebelo* (Figura 12B).

No se encontraron resultados significativos de los valores de MD en el contraste inverso (SC activo < controles).

AD: SC activo > controles: Los valores de AD fueron mayores en los pacientes con SC activo que en los controles, con un punto de máximo aumento en la parte posterior

derecha de la *radiación talámica anterior (ATR)* pero también sobre otras regiones de la *ATR* izquierda, *CST* bilateral, áreas bilaterales del *cíngulo posterior (circunvolución del cíngulo e hipocampos)*, *fórceps mayor*, áreas de la *IFOF* izquierda, *ILF* y *SLF* así como en regiones específicas del *SLF* derecho y cerebelo (Figura 12C).

No se encontraron resultados significativos de los valores de AD en el contraste inverso (SC activo < controles).

RD: SC activo > controles: Los valores de RD en los pacientes con SC activo fueron mayores que los controles, con un aumento máximo localizado en el *fórceps menor* del lóbulo frontal derecho pero también sobre otras regiones del lóbulo frontal, temporal, parietal, occipital y el cerebelo (Figura 12D).

No se encontraron resultados significativos de los valores de RD en el contraste inverso (SC activo < controles).

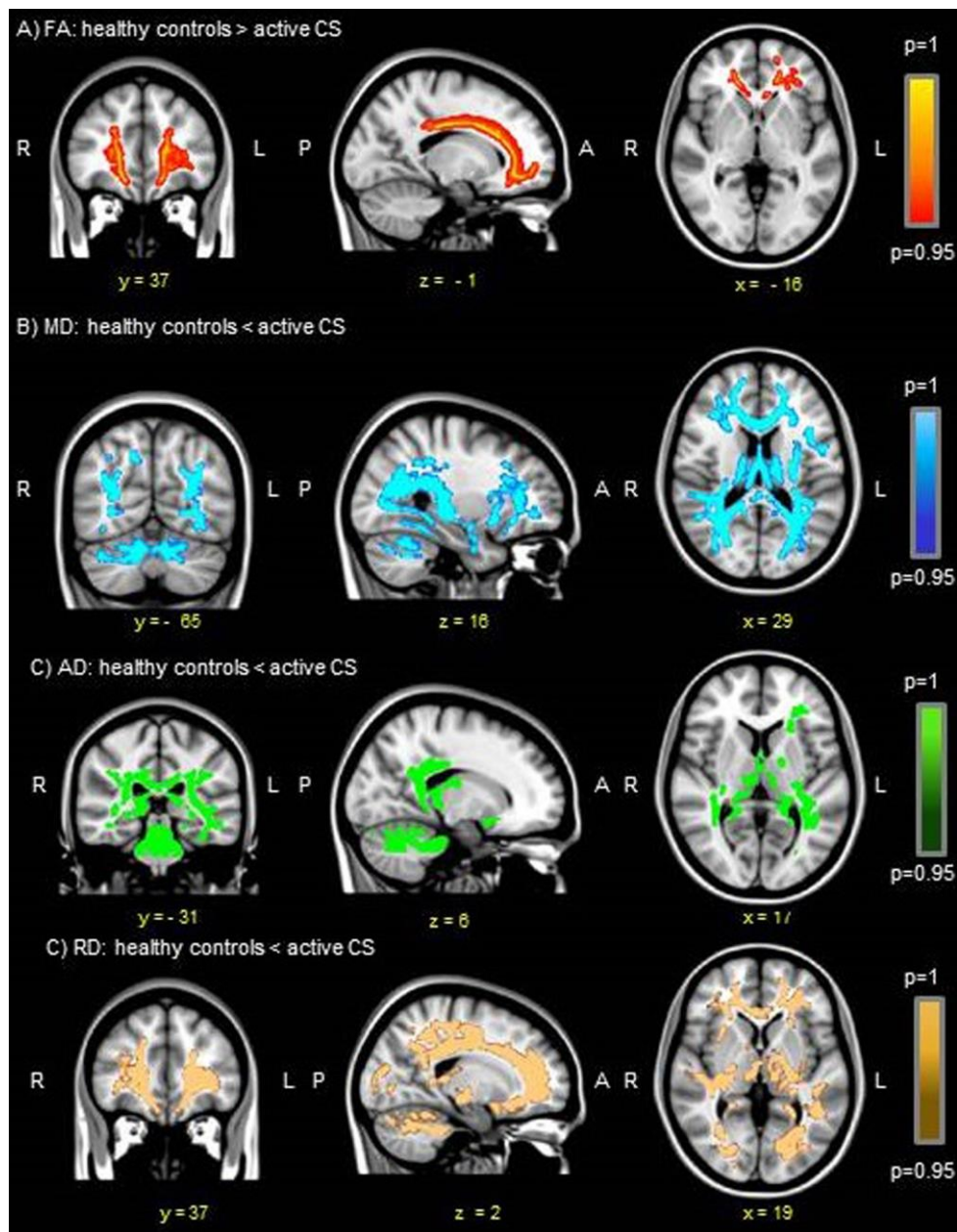


Figura 12. Diferencias de los mapas DTI comparando los pacientes con SC activo frente a controles incluyendo como covariables la hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal. Los vóxeles resaltados con colores rojo y amarillo representan las regiones en las que la FA fue menor (A), los vóxeles resaltados con colores azul y azul claro representan los valores de MD aumentados (B), los vóxeles representados con color verde y verde claro representan aumentos de AD (C) y los vóxeles representado por colores marrón y marrón claro muestran los aumentos de RD (D) en pacientes con SC activo respecto a los controles. Las imágenes de izquierda a derecha muestran los cortes de planos coronal, sagital y axial en las coordenadas de máxima diferencia sobre una imagen estándar MNI152 a un nivel de significación $p < 0.05$ sobre el atlas JHU white-matter tractography, incluido en el programa FSL. R: derecha. L: izquierdo. A: anterior. P: posterior.

2.2.2 SC Controlado *versus* Controles

Los resultados de los análisis de DTI mostraron que el grupo de pacientes con SC controlado presentaba valores reducidos de FA y aumentados de MD y RD con respecto al grupo control, aún incluyendo en el análisis las covariables hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal (Figura 13).

Los resultados en cada uno de los mapas fueron los siguientes:

FA: SC controlado < controles: Los valores de FA fueron menores en los pacientes con SC controlado que en los controles, con una diferencia máxima localizada en la *ATR* izquierda. Otros puntos de disminución de la FA fueron la *CST izquierda*, *circunvolución del cíngulo izquierdo*, *fórceps menor* y algunos vóxels en vías del *IFOF* y *ILF* bilateralmente (Figura 13A).

No se encontraron resultados significativos de los valores de FA en el contraste inverso (SC controlado > controles).

MD: SC controlado > controles: Los valores de MD fueron mayores en los pacientes con SC controlado que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *IFOF* izquierdo pero también extendido sobre los lóbulos frontal, temporal, occipital y el cerebelo del hemisferio izquierdo. En cuanto al hemisferio derecho los aumentos de MD del grupo SC controlado los encontramos en el *CST*, áreas posteriores de la *circunvolución del cíngulo* y el *hipocampo*, *fórceps mayor*, *fórceps menor*, *IFOF*, *ILF* y *SLF* (Figura 13B).

No se encontraron resultados significativos de los valores de MD en el contraste inverso (SC controlado < controles).

AD: No hubo diferencias significativas en los valores de AD entre los pacientes con SC controlado en comparación con los controles para ninguno de los dos contrastes (SC controlado > controles y SC controlado < controles).

RD: SC controlado > controles: Los valores de RD fueron mayores en los pacientes con SC controlado que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *cuerpo calloso* pero también sobre otras áreas de los lóbulos frontal, temporal, parietal, occipital y cerebelo (Figura 13C).

No se encontraron resultados significativos de los valores de RD en el contraste inverso (SC controlado < controles).

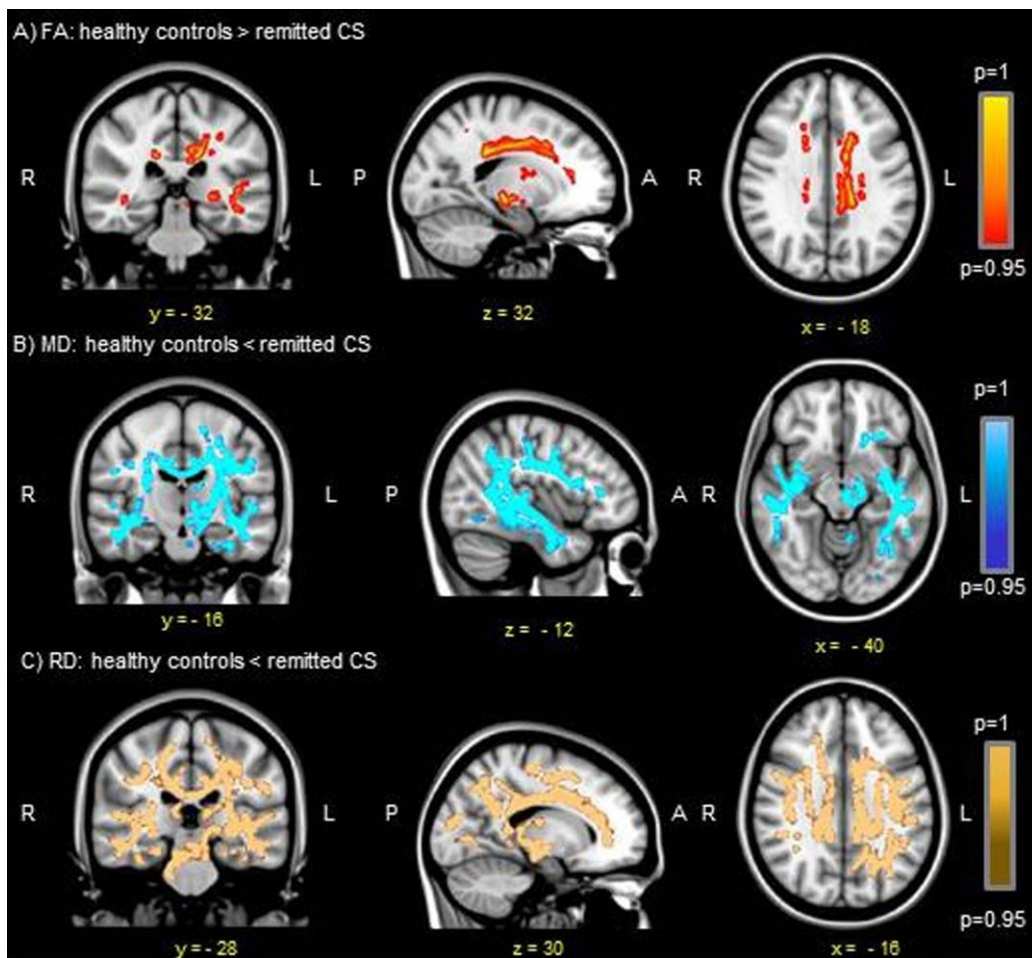


Figura 13. Diferencias de los mapas DTI comparando los pacientes con SC controlado frente a controles incluyendo como covariables la hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal. Los vóxeles resaltados con colores rojo y amarillo representan las regiones en las que la FA fue menor (A), los vóxeles resaltados con colores azul y azul claro representan los valores de MD mayores (B) y los vóxeles representado por colores marrón y marrón claro muestran los aumentos de RD (C) en pacientes con SC controlado respecto a los controles. Las imágenes de izquierda a derecha muestran los cortes de planos coronal, sagital y axial en las coordenadas de máxima diferencia sobre una imagen estándar MNI152 a un nivel de significación $p < 0.05$ sobre el atlas JHU white-matter tractography, incluido en el programa FSL. R: derecha. L: izquierdo. A: anterior. P: posterior.

2.2.3 SC Curado versus Controles

Los resultados de los análisis de DTI mostraron que el grupo de pacientes con SC curado presentaba valores disminuidos de FA y aumentados de MD, AD y RD con respecto al grupo control, aún incluyendo en el análisis las covariables hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal (Figura 14).

Los resultados en cada uno de los mapas fueron los siguientes:

FA: SC curado < controles: Los valores de FA fueron menores en los pacientes con SC curado que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *ILF* derecho pero también sobre el hemisferio derecho de los lóbulos frontal, parietal, temporal y occipital. Los valores de FA en el grupo SC curado también se redujeron en áreas del hemisferio izquierdo sobre la *ATR*, *CST*, *circunvolución del cíngulo*, *fórceps menor*, *IFOF*, *ILF* y *SLF* (Figura 14A).

No se encontraron resultados significativos de los valores de FA en el contraste inverso (SC curado > controles).

MD: SC curado > controles: Los valores de MD fueron mayores en los pacientes con SC curado que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *ILF* izquierdo y también ampliamente distribuido sobre los lóbulos frontal, parietal, temporal y occipital bilateralmente (Figura 14B).

No se encontraron resultados significativos de los valores de MD en el contraste inverso (SC curado < controles).

AD: SC curado > controles: Los valores de AD fueron mayores en los pacientes con SC curado que en los controles, con una diferencia máxima localizada en el *SLF* izquierdo pero también sobre la *ATR* y *CST* del hemisferio izquierdo, áreas posteriores de *la circunvolución del cíngulo bilateralmente*, el *hipocampo izquierdo*, *fórceps mayor*, el *IFOF* bilateralmente, *ILF* izquierdo, y *SLF* derecho (Figura 14C).

No se encontraron resultados significativos de los valores de AD en el contraste inverso (SC curado < controles).

RD: SC curado > controles: Los valores de RD fueron mayores en los pacientes con SC curado que en los controles con una diferencia máxima localizada en el *IFOF* derecho pero también sobre los lóbulos frontal, temporal, parietal y occipital (Figura 14D).

No se encontraron resultados significativos de los valores de RD en el contraste inverso (SC curado < controles).

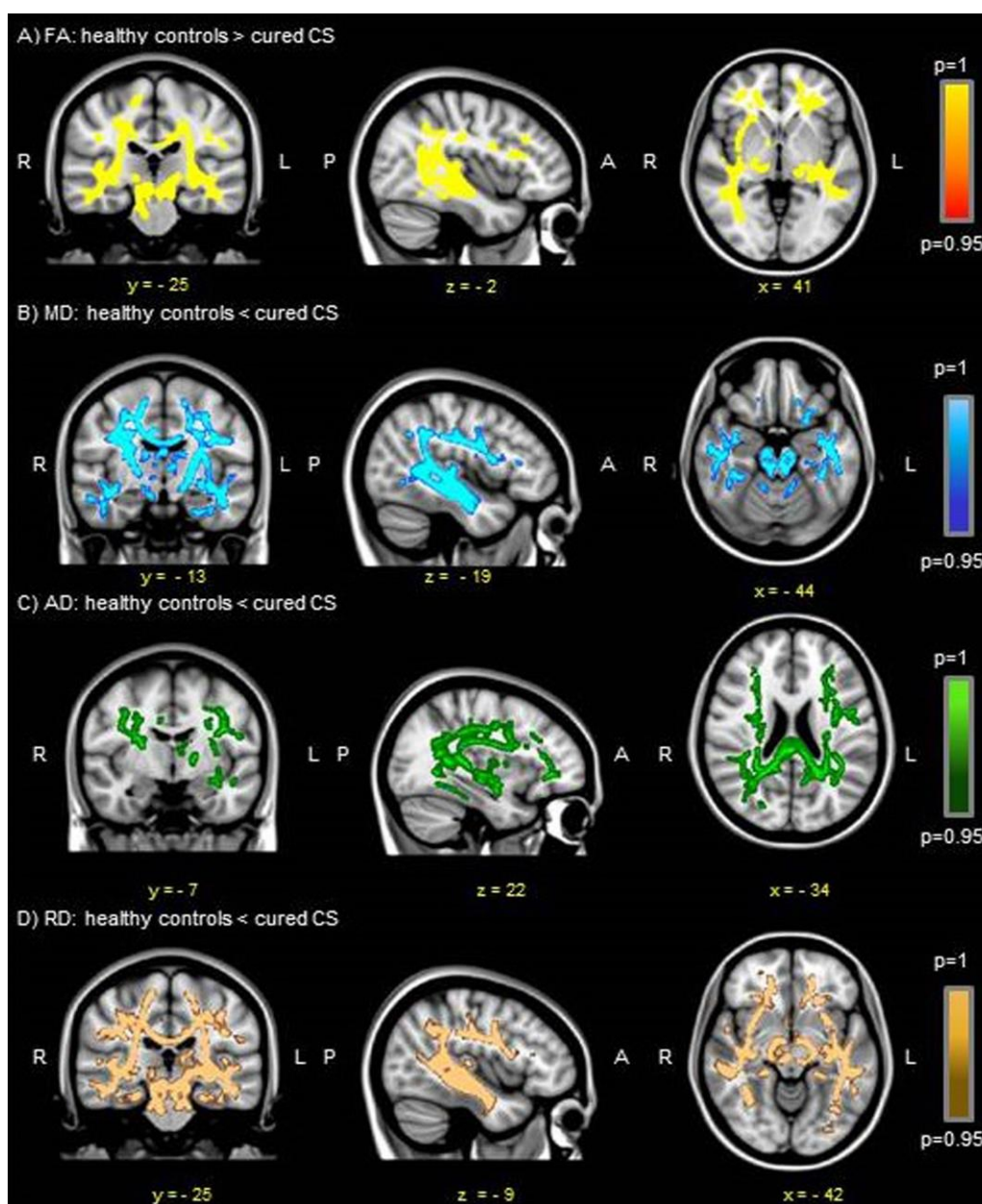


Figura 14. Diferencias de los mapas DTI comparando los pacientes con SC curado frente a controles incluyendo como covariables la hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal. Los vóxeles resaltados con colores rojo y amarillo representan las regiones en las que el valor de la FA fue menor (A), los vóxeles resaltados con colores azul y azul claro representan los valores de MD aumentados (B), los vóxeles representados con color verde y verde claro representan aumentos de AD (C) y los vóxeles representado por colores marrón y marrón claro muestran los aumentos de RD (D) en pacientes con SC curado respecto a los controles. Las imágenes de izquierda a derecha muestran los cortes de planos coronal, sagital y axial en las coordenadas de máxima diferencia sobre una imagen estándar MNI152 a un nivel de significación $p < 0.05$ sobre el atlas JHU white-matter tractography, incluido en el programa FSL. R: derecha. L: izquierdo. A: anterior. P: posterior.

2.3.4 SC activo versus SC controlado versus SC curado

No se encontraron diferencias al comparar los 3 grupos de pacientes con SC entre sí (en ninguna de las comparaciones entre SC activo > SC controlado, SC activo < SC controlado, SC activo > SC curado, SC activo < SC curado, SC controlado > SC curado ni SC controlado < SC curado) para ninguno de los mapas de DTI (FA, MD, AD o RD).

3. Análisis 3. Relación entre valores de la sustancia blanca (FA, MD, AD y RD) y la exposición a cortisol (cortisol en orina de 24 horas y duración de la enfermedad en meses).

No se encontraron correlaciones entre ninguno de los mapas de DTI (FA, MD, AD y RD) y la concentración de cortisol en orina 24 de horas, ni con la duración de la enfermedad medida en meses.

4. Análisis 4. Evaluación neuropsiquiátrica (depresión y ansiedad) y cognitiva (velocidad de procesamiento de la información)

Evaluación de la sintomatología depresiva

Los resultados mostraron diferencias en cuanto a la sintomatología depresiva en los 3 grupos de pacientes: SC activo, SC controlado y SC curado con respecto a los controles. No se apreciaron diferencias en las comparaciones entre el resto de los grupos (Tabla 2).

Evaluación de la sintomatología ansiosa:

Las puntuaciones totales del inventario de ansiedad STAI *estado* difirieron de las del grupo control, que fueron más bajas que en los grupos de pacientes: SC activo y SC curado. No se apreciaron diferencias en las comparaciones entre el resto de los grupos (Tabla 2).

El inventario de ansiedad STAI *rasgo*, fue más bajo en el grupo control, que en todos los grupos de pacientes: SC activo, SC controlado y SC curado. No se aprecian diferencias en las comparaciones entre el resto de los grupos (Tabla 2).

Evaluación del rendimiento de la velocidad de procesamiento de la información

Los resultados de las puntuaciones del SDMT no mostraron diferencias entre ninguno de los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado de las comparaciones entre grupos respecto a los datos neuropsicológicos y cognitivos

	Controles	SC Activo	SC Controlado	SC Curado	F/ χ^2	Valor de p	Post-hoc
BDI-II	3.20 \pm 3.4	10.38 \pm 2.9	8.86 \pm 5.3	10.50 \pm 6.9	12.36	<0.001	(1)
STAI Estado	11.40 \pm 7.2	22.75 \pm 10.2	17.43 \pm 10.5	18.95 \pm 11.8	4.77	0.005	(2)
STAI Rasgo	13.23 \pm 7.2	25.75 \pm 7.8	24.00 \pm 12.4	24.35 \pm 10.5	9.6	<0.001	(3)
SDMT	61.74 \pm 8.84	61.46 \pm 9.55	55.43 \pm 10.56	63.60 \pm 10.028	1.34	0.267	NS

Los valores están expresados en Media \pm Desviación Típica (DT)
NS: No Significativo

(1) Controles – SC Activo **p=0.002**; Controles – SC Controlado **p=0.030**; Controles – SC Curado **p=0.001**; SC Activo – SC Controlado p=NS; SC Activo – SC Curado p=NS; SC Controlado – SC Curado p=NS.

(2) Controles – SC Activo **p=0.016**; Controles – SC Controlado p=NS; Controles – SC Curado **p=0.028**; SC Activo – SC Controlado p=NS; SC Activo – SC Curado p=NS; SC Controlado – SC Curado p=NS

(3) Controles - SC Activo **p=0.003**; Controles – SC Controlado **p=0.023**; Controles – SC Curado **p=0.001**; SC Activo – SC Controlado p=NS; SC Activo – SC Curado p=NS; SC Controlado – SC Curado p=NS

5. Análisis 5. Relación entre los valores de sustancia blanca (FA, MD, AD y RD) y la sintomatología depresiva, ansiosa y rendimiento cognitivo

Mapas DTI y sintomatología depresiva

Las puntuaciones del inventario de depresión de Beck correlacionaron negativamente con los valores de FA, específicamente sobre las áreas del *CST* derecho, *fórceps mayor*, *fórceps menor*, *IFOF* izquierdo (parte frontal), *IFOF* derecho, *ILF* derecho, *SLF* izquierdo (parte anterior) y *SLF* derecho (Figura 15A). La media de los valores de FA de cada sujeto con respecto a sus puntuaciones en el inventario de depresión de Beck mostraron una distribución lineal con resultados significativos $p < 0.01$; $r = -0.572$ (Figura 16).

Las puntuaciones del inventario de depresión de Beck correlacionaron positivamente con los valores de RD, específicamente en las regiones frontales del *fórceps menor* y áreas frontales bilaterales del *IFOF* (Figura 15B). Los valores medios de RD de cada sujeto

respecto a sus puntuaciones en el inventario de depresión de Beck, mostraron una distribución lineal con resultados significativos $p < 0.01$; $r = 0.468$ (Figura 17).

No hubo diferencias en las correlaciones inversas (i.e. positivas en FA ni negativas de RD con respecto al inventario de depresión de Beck). Tampoco hubo correlaciones (positivas ni negativas) al comparar los mapas MD y AD con las puntuaciones del inventario de depresión de Beck.

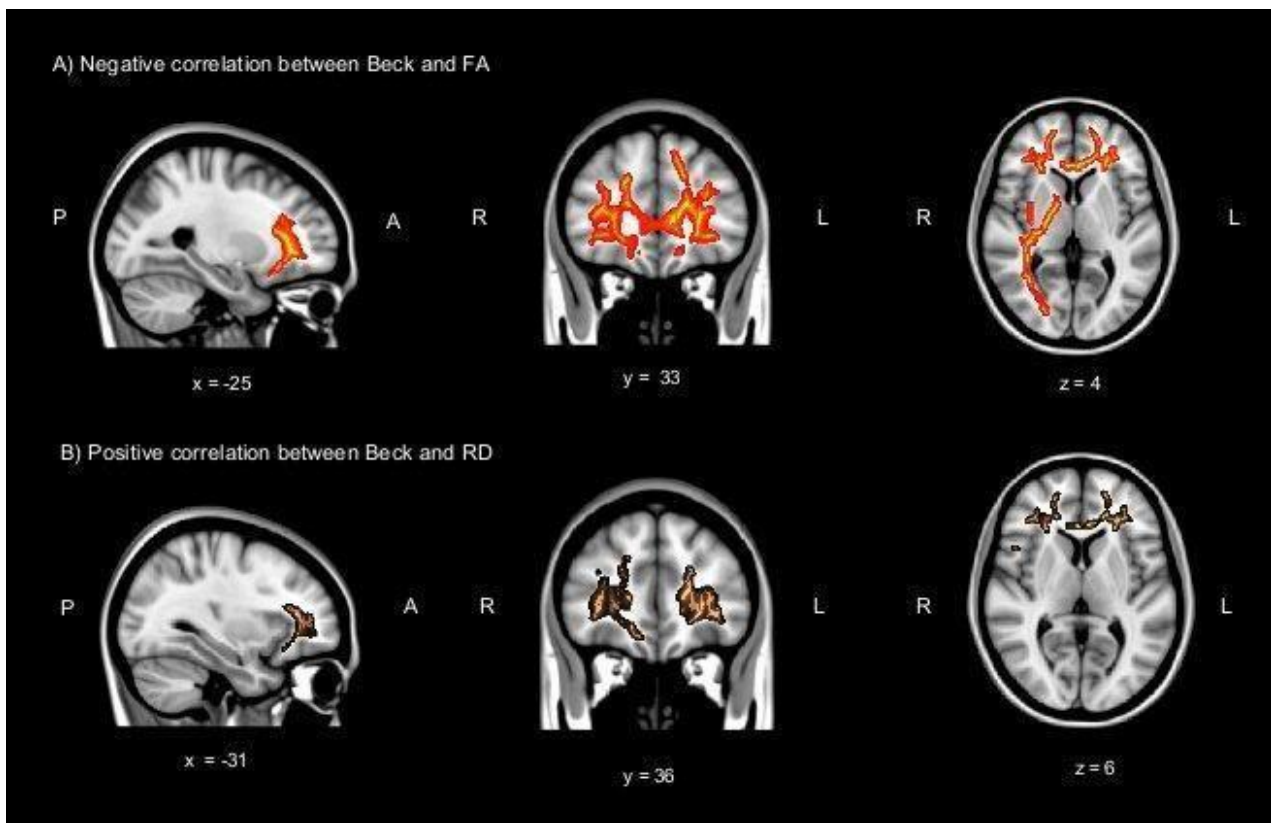


Figura 15. Correlación entre los valores de los mapas de DTI y la sintomatología depresiva. La figura 15A muestra correlaciones negativas (color rojo-amarillo) entre los valores de FA y las puntuaciones en el inventario de depresión de Beck. La figura 15B muestra correlaciones positivas (color marrón-marrón claro) entre los valores de RD y las puntuaciones en el inventario de depresión de Beck. Las imágenes de izquierda a derecha muestran los cortes de planos sagital, coronal y axial en las coordenadas de máxima diferencia sobre una imagen estándar MNI152 a un nivel de significación $p < 0.05$ sobre el atlas JHU white-matter tractography, incluido en el programa FSL. R: derecha. L: izquierdo. A: anterior. P: posterior.

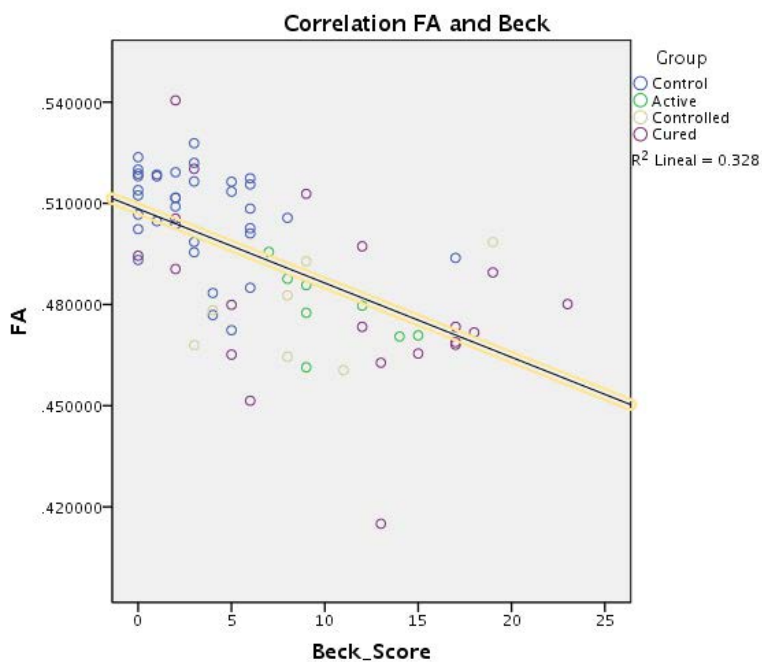
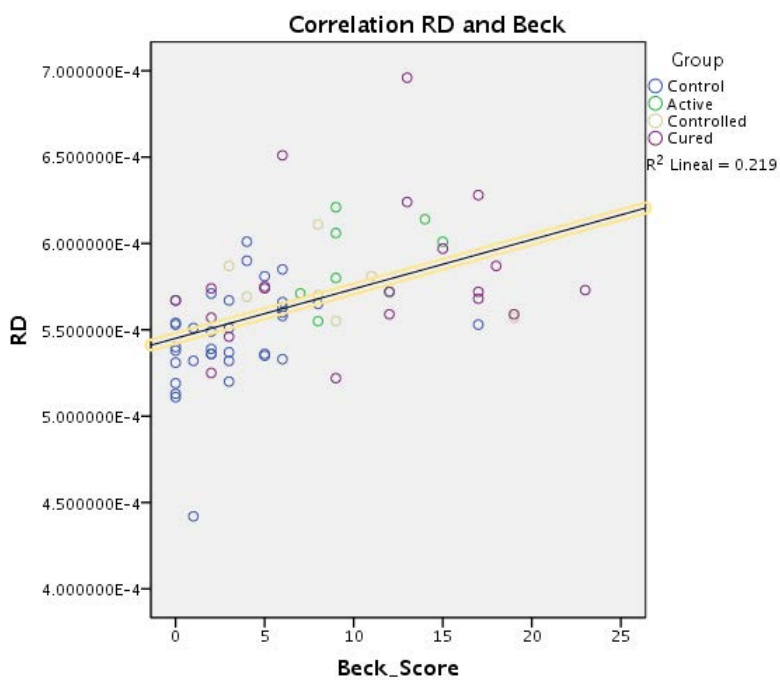


Figura 16. Correlaciones negativas entre la media de los valores de FA de cada sujeto con respecto a sus puntuaciones en el inventario de depresión de Beck (en controles, SC activo, SC controlado y SC curado). Eje Y: valores de FA de áreas significativas. Eje X: Los resultados del inventario de depresión de Beck.

Figura 17. Correlaciones positivas entre los valores RD de cada sujeto con respecto a sus puntuaciones en el inventario de depresión de Beck (en controles, SC activo, SC controlado y SC curado). Eje Y: valores de RD de áreas significativas. Eje X: Los resultados del inventario de depresión de Beck.



Mapas DTI y sintomatología ansiosa

No hubo correlaciones de los mapas de DTI (FA, MD, AD ni RD) con las puntuaciones en el inventario STAI en las escalas de ansiedad *estado* ni *rasgo*.

Mapas DTI y velocidad de procesamiento de la información

Las puntuaciones en la prueba SDMT de velocidad de procesamiento de la información, correlacionaron positivamente con los valores de FA, concretamente en regiones bilaterales de la *ATR*, *CST* bilateralmente, *circunvolución del cíngulo izquierda*, *cíngulo derecho del hipocampo*, *fórceps mayor*, *fórceps menor*, *IFOF* bilateral, *ILF* derecho, *SLF* bilateral y *UF* bilateral (Figura 18A). Los valores de FA de cada sujeto relacionado con sus puntuaciones en SDMT mostraron una distribución lineal con resultados significativos $p < 0.01$; $r = 0.587$ (Figura 19).

Las puntuaciones en la prueba SDMT de velocidad de procesamiento de la información, se correlacionaron positivamente con los valores de AD en el *CST* derecho (Figura 18B). Los valores de AD de cada sujeto correlacionaron con las puntuaciones del SDMT mostraron una distribución lineal significativa $p < 0.01$; $r = 0.486$ (Figura 20).

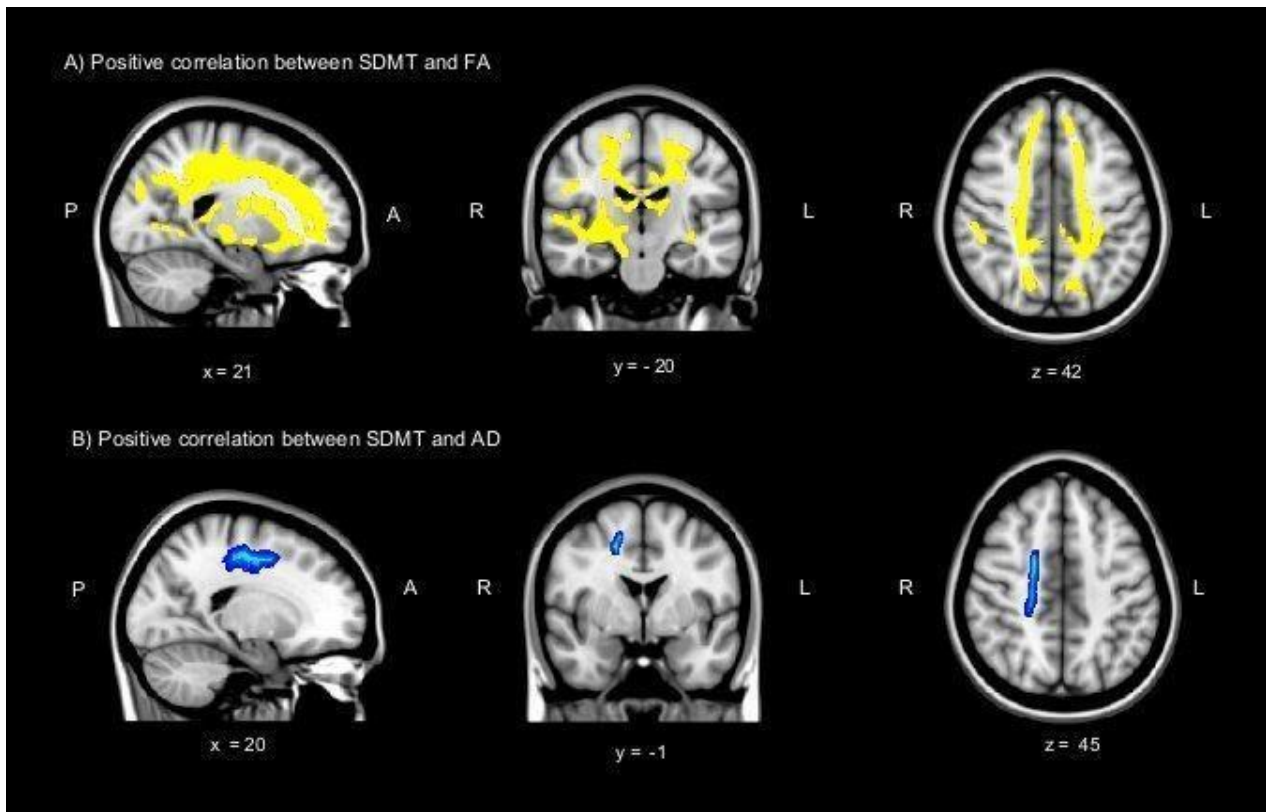


Figura 18. Correlación entre los valores de los mapas DTI y rendimiento en SDMT. La figura 18A muestra las correlaciones positivas (color rojo y amarillo) entre los valores de FA y las puntuaciones de rendimiento en SDMT. La figura 18B muestra correlaciones positivas (color azul y azul claro) entre los valores de AD y las puntuaciones de rendimiento en SDMT. Las imágenes de izquierda a derecha muestran los cortes de planos sagital, coronal y axial en las coordenadas de máxima diferencia sobre una imagen estándar MNI152 a un nivel de significación $p < 0.05$ sobre el atlas JHU white-matter tractography, incluido en el programa FSL. R: derecha. L: izquierdo. A: anterior. P: posterior.

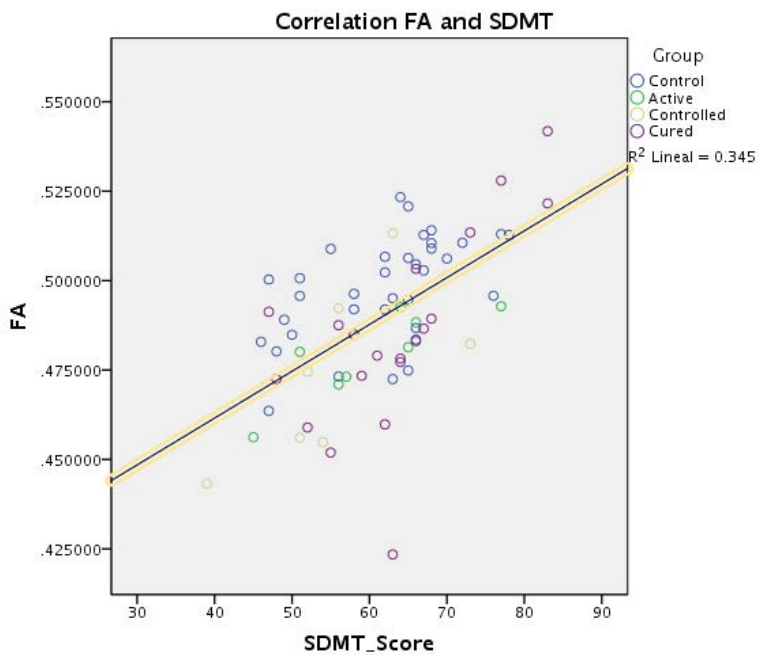
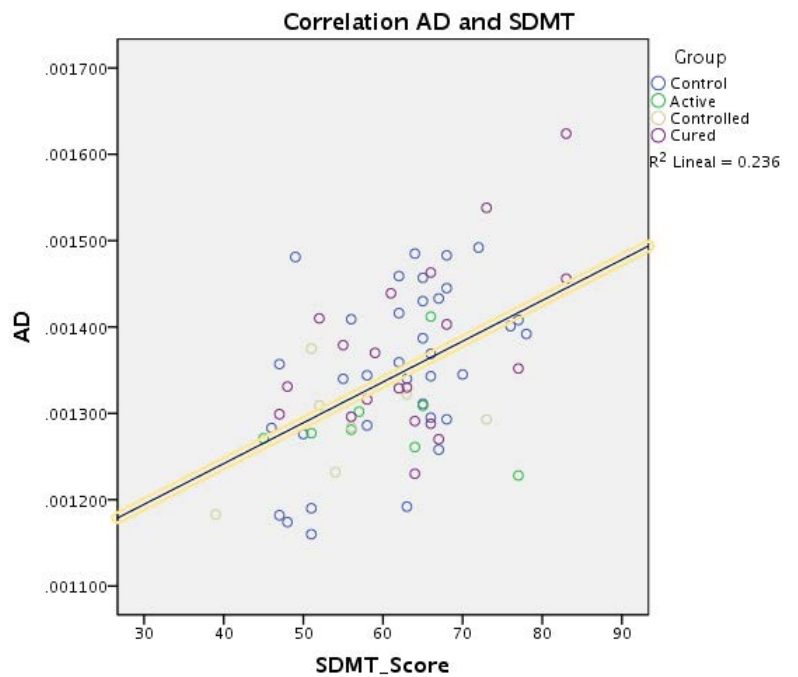


Figura 19. Correlaciones positivas entre la media de los valores de FA de cada sujeto y los resultados de SDMT (en controles, SC activo, SC controlado y SC curado). Eje Y: valores de FA de áreas significativas. Eje X: Puntuaciones de la prueba de velocidad de procesamiento SDMT.

Figura 20. Correlaciones positivas entre la media de los valores de AD de cada sujeto y los resultados de SDMT (en controles, SC activo, SC controlado y SC curado). Eje Y: valores de AD de las áreas significativas. Eje X: Puntuaciones de la prueba de velocidad de procesamiento SDMT.



DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis demuestran la presencia de anomalías en la microestructura de la SB en pacientes con SC. Dichos valores de DTI se correlacionan con sintomatología depresiva y rendimiento cognitivo (menor velocidad de procesamiento de la información).

Para estudiar la existencia de alteraciones de la SB en el SC, realizamos dos análisis de DTI. En primer lugar, todos los pacientes con SC se compararon con sus controles apareados por edad, género y nivel educativo. El grupo de pacientes con SC mostró alteraciones de la SB en comparación con el grupo control, de acuerdo con nuestra hipótesis inicial. Se observaron múltiples alteraciones de la SB, concretamente, una disminución de los valores de FA y un aumento de los de MD y RD, ampliamente distribuidos en el cerebro, así como valores de AD aumentados en áreas centrales. En el segundo análisis de DTI, se evaluó el estado de la SB comparando los grupos: SC activo, SC controlado, SC curado y controles, con el fin de establecer las características específicas de la SB en función de la situación clínica de los pacientes con SC. Los grupos SC activo y SC curado, mostraron el mismo patrón de anomalías de la SB en comparación con los controles, concretamente una reducción muy extendida en el cerebro de los valores de FA y un aumento de los valores MD, RD y parcialmente también de AD. El grupo de SC controlado, mostró una disminución de los valores de FA y un aumento en los valores MD y RD en comparación con los controles, sin mostrar diferencias en los valores AD.

Cada mapa de DTI proporciona información específica sobre los diferentes aspectos de la microestructura de la SB cerebral. FA y MD son mapas que describen las características generales de la difusión de la SB; FA refleja la coherencia de las fibras, mientras que MD

refleja la magnitud local de difusión general. AD se extrae de la difusión paralela a las vías, que proporciona información axonal y RD de la difusión perpendicular, que proporciona información sobre la mielina (Beaulieu, 2002).

Aunque en la mayoría de estudios de DTI los valores de FA han sido los más utilizados, es importante visualizar el patrón completo de los diferentes mapas de DTI para una comprensión más profunda y global del escenario en el que se encuentra el estado de la SB. Puesto que las características microestructurales de la SB se valora con los resultados de difusión, medidas indirectas tomadas de la estructura biológica real, deben ser interpretadas con precaución (Wheeler-Kingshott y Cercignani, 2009; Jones et al., 2013). La combinación de disminución de la FA y aumento de MD se ha visto en el proceso de envejecimiento normal con deterioro de la microestructura de la SB (Minati et al., 2007). En este sentido, es frecuente observar en los pacientes con SC problemas que son comunes en personas mayores, y es posible que el exceso de los niveles de GC pueda contribuir al envejecimiento cerebral (Goossens y Sapolsky, 2007). Nuestros resultados de DTI incluyen disminuciones de FA y aumentos de MD y RD en áreas extensas del cerebro, y aumentos localizados de AD en pacientes SC activo y SC curado. Este patrón fue descrito como un escenario de degeneración crónica de la SB, prevalente en el envejecimiento normal, que podría reflejar un aumento del volumen extracelular y una menor densidad de la membrana como consecuencia de pérdida axonal y de mielina, mayor espacio interaxonal y reducción de la tortuosidad extracelular (Burzynska et al., 2010). Este deterioro de la SB a consecuencia del envejecimiento normal, podría ser análogo al de los pacientes con SC (Goossens y Sapolsky, 2007). Dado que se han observado alteraciones de la SB ampliamente distribuidas en el cerebro de pacientes con

SC activo y SC curado, parecería indicar que los daños de la microestructura de la SB son extensos y, que además no son completamente reversibles incluso después de la curación de la enfermedad.

Algunos estudios de seguimiento y evolución del estado cerebral en pacientes con SC, reportaron cierto grado de reversibilidad del volumen cerebral (Bourdeau et al., 2005) y de la atrofia hipocampal (Starkman et al., 1999) después de la corrección del hipercortisolismo, pero sin llegar a normalizarse. En un estudio reciente, encontramos anomalías en las concentraciones de metabolitos localizadas en el hipocampo de pacientes con SC curado, que sugerían disfunción y/o pérdida neuronal, así como proliferación glial como mecanismo reparador (Resmini et al., 2013). Estas alteraciones podrían estar vinculadas a las alteraciones microestructurales de la SB observadas en la DTI de los pacientes con SC curado que hemos hallado. Por otro lado, todas estas alteraciones de la microestructura cerebral, podrían estar reflejando fenómenos inflamatorios observadas tras la exposición crónica a cortisol sobre del SNC (Sorrells y Sapolsky, 2007).

El patrón de los mapas de DTI de los pacientes con SC controlado frente a los controles, mostró en los primeros una disminución de los valores de FA, aumento de los valores de MD y RD y mantenimiento de los valores de AD, un patrón que se ha vinculado a procesos de desmielinización y pérdida axonal (Acosta-Cabronero et al., 2010; Burzynska et al., 2010). Las alteraciones en la SB en los pacientes con SC controlado indicarían, una vez más, la persistencia del daño microestructural de la SB a pesar de haber controlado el hipercortisolismo con medicación.

Por otra parte, los niveles elevados de cortisol se asocian a complicaciones vasculares en pacientes con SC (Miljic et al., 2012; Fallo y Sonino, 2009), que podrían determinar una afectación microestructural en el cerebro de los pacientes con SC. Se ha confirmado que las variables que determinan mayor riesgo vascular diferían entre grupos (hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal), por lo que fueron incluidas en los análisis de DTI como covariables. Puesto que los mapas de DTI mostraron extensas alteraciones de la SB en los pacientes con SC a pesar de controlar los factores de riesgo vascular, creemos que la exposición a hipercortisolismo ha jugado un papel importante en dichas alteraciones. Sin embargo, a pesar de que existen estudios que relacionan directamente el exceso de cortisol con daño en el SNC (Herbert et al., 2006), las correlaciones realizadas no revelaron una relación entre los mapas de DTI y la concentración de cortisol en orina de 24 horas, ni con la duración de la enfermedad. De todas maneras, no puede descartarse un efecto directo del hipercortisolismo en las alteraciones de la SB, pues la estimación de la duración de la enfermedad es subjetiva y retrospectiva, y la concentración de cortisol en orina de 24 horas es actual y no corresponde al momento de máxima actividad de la enfermedad.

No puede descartarse tampoco que las alteraciones de la SB puedan en parte también ser al estado inflamatorio presente en pacientes con SC (Sorrells y Sapolsky, 2007), persistente en los pacientes con SC curado (Barahona et al., 2009).

Los valores en los mapas de DTI no mostraron diferencias comparando los diferentes grupos de SC entre sí, es decir, SC activo, SC controlado y SC curado; sin embargo cada uno de ellos había mostrado diferencias frente al grupo control. Este hecho parece indicar la presencia de daños similares de la microestructura de la SB en todos los grupos de

pacientes con SC, independientemente de los niveles actuales de cortisol. Además, estas alteraciones cerebrales, presumiblemente ocurridas durante las primeras fases de hipercortisolismo, no son completamente reversibles una vez que el cortisol se normaliza después de la terapia. Así lo confirma también el estudio de DTI de van der Werff et al., 2014 en pacientes con EC con hipercortisolismo en remisión, donde se describen hallazgos similares a los nuestros, que muestran una extensa disminución de la integridad de la SB a través de prácticamente todas las fibras cerebrales. Al analizar mediante el resto de mapas de DTI y más concretamente en regiones de interés (cuerpo calloso, circunvolución del cíngulo bilateral y UF bilateral) hallaron un patrón muy similar al que obtuvimos en nuestros resultados con un aumento de MD, RD y mantenimiento de AD.

Los resultados de nuestro estudio al evaluar la sintomatología psiquiátrica revelaron diferencias en el inventario de depresión de Beck, presentando más sintomatología depresiva los pacientes con SC activo, SC controlado y SC curado comparativamente con los controles sanos. Estos resultados refuerzan los hallazgos previos que muestran una vulnerabilidad al estrés (Sonino et al., 1998) y presencia de sintomatología psiquiátrica en el SC (Sonino et al., 2001), siendo el trastorno depresivo la principal comorbilidad psiquiátrica (Sonino et al, 2010; Starkman et al., 1981). Además, el hecho de que exista mayor sintomatología psiquiátrica en los pacientes con SC curado con respecto a los controles, refuerza los hallazgos sobre el deterioro de la calidad de vida en los estudios de seguimiento de los pacientes con SC (van der Klaauw et al., 2008) y la presencia persistente de sintomatología psiquiátrica (Sonino et al., 2004; Sobrinho, 2004; Pereira et al., 2010), aunque otros estudios describen una mejoría tanto de la depresión como la ansiedad, después de la normalización de los niveles de cortisol (Kelly et al, 1996).

En el análisis caso-control, se encontró que los síntomas depresivos estaban relacionados con la calidad del estado de la SB, mostrando mayores puntuaciones de sintomatología depresiva en relación a mayores patrones de deterioro en el estado microestructural de la SB (i.e, disminución de valores de FA y aumento de los valores de RD). Van der Werff y colaboradores (2014) hallaron en su estudio resultados muy similares a los nuestros con correlaciones negativas entre FA y puntuaciones de sintomatología depresiva en sus pacientes con EC en remisión. Los valores bajos de FA indican irregularidades de la coherencia en la estructura del estado de las fibras, que junto a los valores altos de RD, indican un patrón relacionado con la pérdida de mielina (Song et al., 2002). En este sentido, algunos estudios han relacionado cambios en la estructura de la SB cerebral y en la expresión de genes de mielina con factores contribuyentes al estado de ánimo y la cognición en varios trastornos psiquiátricos (Fields, 2008). Nuestro análisis ha confirmado una mayor sintomatología depresiva en este patrón de dismielinización localizado principalmente en el lóbulo frontal, área que con frecuencia se ha implicado en trastornos afectivos. Las alteraciones de la SB se han documentado en depresión de manera consistente, principalmente mostrando disminuciones de FA en zonas fronto-límbicas (Sexton et al., 2009), sobre todo cuando se trata de depresión de aparición tardía (Sexton et al, 2012). En otro estudio realizado recientemente con pacientes depresivos, se ha evidenciado reducciones en los valores de FA en regiones fronto-límbicas en aquellos pacientes depresivos resistentes al tratamiento (Diego-Adeliño et al., 2013). Estos estudios en pacientes depresivos respaldan que, al menos en parte, los estados de ánimo están relacionados con la calidad de la SB. De igual manera, las alteraciones de la SB podrían influir en la mayor sintomatología depresiva de nuestros pacientes con SC.

Por otra parte, la literatura previa ha demostrado que los pacientes con SC presentan con frecuencia un síndrome depresivo-ansioso comórbido (Loosen et al., 1992). Mazet et al. (1981) encontraron manifestaciones psiquiátricas de ansiedad y depresión en pacientes con SC suprarrenal e hipofisario. Nuestros resultados mostraron más síntomas de ansiedad *rasgo* en los pacientes con SC activo, SC controlado y SC curado, en comparación con los controles sanos. Por otro lado, sólo se evidenció más ansiedad *estado* en pacientes con SC activo y SC curado en comparación con los controles sanos, pero sin diferencias entre SC controlado y controles. Este hecho podría indicar que la medicación prescrita en SC podría mejorar el estado de ansiedad, además de los síntomas endocrinos generales. Respecto a los valores de DTI, no se encontraron relaciones con la sintomatología ansiosa (*estado* ni *rasgo*). No tenemos constancia de que existan estudios previos que relacionen la sintomatología ansiosa y la SB en el SC. Literatura previa correlacionó negativamente los niveles de ansiedad *rasgo* y los valores de FA en vías entre la amígdala y las áreas prefrontales, usando una muestra de sujetos sanos (Kim and Whalen, 2009); sin embargo, los estudios de este tipo son pequeños e inconsistentes en los trastornos de ansiedad (Ayling et al., 2012). Por ejemplo, Modi y cols. (2013) encontraron correlaciones positivas entre las puntuaciones de ansiedad *rasgo* y valores de FA en el fórnix y el UF.

Por otra parte, se han descrito déficits cognitivos en el SC (Sonino et al., 2001), concretamente en funciones verbales de pacientes con EC en función del grado de hipercortisolismo (Starkman et al., 2001). Nuestro estudio no mostró diferencias en velocidad de procesamiento de la información, medida con la prueba *oral* SDMT, entre los grupos de pacientes con SC y los controles. Esta es una función altamente relacionada

con la estructura de la SB (Fields et al., 2008). Las anomalías microestructurales de la SB se han visto previamente asociadas a un pobre rendimiento en la prueba, mostrando correlaciones negativas entre los valores de FA y el tiempo de reacción en población geriátrica general (Kerchner et al., 2012). Sin embargo, no tenemos constancia de que existan estudios analizando el estado microestructural de la SB en relación con la velocidad de procesamiento de la información en el SC. Nuestros resultados mostraron que los valores altos de FA, dispersos en todo el cerebro y valores altos de AD, localizados en el extremo derecho del CST, correlacionaban positivamente con el rendimiento del SDMT. Esto parecería indicar que la buena calidad de la SB determinaría una mejor ejecución en el procesamiento de la información. Se ha encontrado valores bajos de FA relacionado con menor velocidad de procesamiento en la depresión tardía (Sexton et al., 2012). Es posible, por lo tanto que haya una relación entre la calidad de la SB, tendencias depresivas y la función de la velocidad de procesamiento de la información.

Estos estudios tienen algunas limitaciones. Al tratarse de una enfermedad rara los estudios se han realizado en una muestra relativamente pequeña. Este hecho ha podido tener influencia en el patrón de mapas de DTI en SC controlado en comparación con los controles, que mostró una disminución de FA y aumento de MD y RD pero sin incremento de AD como ocurría en SC activo y SC curado respecto a los controles. Tampoco se observaron diferencias de sintomatología ansiosa en la escala *estado* del inventario de ansiedad STAI entre el SC controlado y controles, aunque ello podría deberse al efecto positivo del tratamiento endocrino. Los análisis de DTI, aunque robustos debido a la fuerza del método estadístico, son de carácter transversal y no longitudinal, por lo que no

evalúan el estado de la microestructura de la SB a lo largo del proceso de la enfermedad. Por lo tanto, no se puede asegurar una relación causa-efecto entre las diferentes etapas de la enfermedad y el cortisol. En lo relativo a la cognición, no se encontraron, diferencias en la velocidad de procesamiento entre los grupos de SC y controles. Tampoco se detectaron correlaciones entre la duración de la enfermedad ni concentración de cortisol en orina de 24 horas y los mapas de DTI, si bien la duración estimada del hipercortisolismo puede no reflejar la duración real y la concentración actual de cortisol en orina de 24 horas solo informa de la situación puntual.

CONCLUSIONES

- 1.- Los pacientes con SC presentan extensas anomalías en la microestructura de la SB cerebral en comparación con controles sanos apareados por sexo, edad y nivel educativo.
- 2.- Dichas alteraciones en los pacientes con SC son compatibles con degeneración crónica de la SB (disminución de FA y aumento de valores de MD, RD y parcialmente en AD) similar a lo descrito en el envejecimiento normal.
- 3.- Las alteraciones de la SB en el SC se mantienen tras ajustar por las variables de riesgo cardiovascular (hipertensión, hipertrigliceridemia, obesidad central e índice de masa corporal) y difieren entre los grupos.
- 4.- Las alteraciones en la SB cerebral en el SC se observan independientemente de la situación clínica de los pacientes (SC activo, SC controlado y SC curado). Esto podría indicar que el efecto glucotóxico producido en la fase de hipercortisolismo no es totalmente reversible.
- 5.- No se han hallado correlaciones entre la concentración actual de cortisol en orina de 24 horas o la duración estimada del hipercortisolismo con los mapas de DTI, lo que sugiere que las alteraciones de la SB tras hipercortisolismo, una vez producidas se perpetúan, lo que podría estar determinado por fenómenos de inflamación crónica de bajo grado.
- 6.- Los pacientes (SC activo, SC controlado y SC curado) muestran mayor sintomatología depresiva en comparación al grupo control.

7.- Se observa una correlación entre el patrón de DTI ligado a desmielinización (disminución de la FA y aumento de RD) y la sintomatología depresiva, principalmente en el lóbulo frontal, área implicada en la depresión.

8.- Los grupos de SC activo y SC curado mostraron peores puntuaciones que el grupo control con respecto a la sintomatología ansiosa, tanto en *estado* como en *rasgo*. El grupo de SC controlado mostró peores puntuaciones en *rasgo*, pero no en la escala de ansiedad *estado*.

9.- No se encontraron correlaciones entre las alteraciones en DTI y la sintomatología ansiosa (*estado* ni *rasgo*).

10.- Las puntuaciones de la velocidad de procesamiento de la información evaluadas con la prueba SDMT, no diferían entre grupos (pacientes con SC activo, SC controlado y SC curado y controles).

11.- Se hallaron correlaciones positivas entre mejor puntuación en el rendimiento de velocidad de procesamiento de la información e integridad de la SB (aumento de FA y AD).

REFERENCIAS

- Acosta-Cabronero J, Williams GB, Pengas G, Nestor PJ. Absolute diffusivities define the landscape of white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Brain*. 2010 Feb;133(Pt 2):529–39.
- Andela CD, van Haalen FM, Ragnarsson O, Papakokkinou E, Johannsson G, Santos A, et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. *Eur J Endocrinol*. 2015 Jul;173(1):R1-14.
- Arnaldi G, Mancini T, Polenta B, Boscaro M. Cardiovascular risk in Cushing's syndrome. *Pituitary*. 2004;7(4):253–6.
- Arnaldi G, Mancini T, Tirabassi G, Trementino L, Boscaro M. Advances in the epidemiology, pathogenesis, and management of Cushing's syndrome complications. *J Endocrinol Invest*. 2012 Apr;35(4):434–48.
- Aulinas A, Valassi E, Webb SM. Prognosis of patients treated for Cushing syndrome. *Endocrinol Nutr*. 2014 Jan;61(1):52–61.
- Ayling E, Aghajani M, Fouche J-P, van der Wee N. Diffusion tensor imaging in anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2012 Jun;14(3):197–202.
- Barahona M-J, Sucunza N, Resmini E, Fernández-Real J-M, Ricart W, Moreno-Navarrete J-M, et al. Persistent body fat mass and inflammatory marker increases after long-term cure of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Sep;94(9):3365–71.
- Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J*. 1994 Jan;66(1):259–67.

- Beaulieu C. The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review. *NMR Biomed.* 2002 Dec;15(7–8):435–55.
- Bourdeau I, Bard C, Forget H, Boulanger Y, Cohen H, Lacroix A. Cognitive function and cerebral assessment in patients who have Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2005 Jun;34(2):357–369, ix.
- Burzynska AZ, Preuschhof C, Bäckman L, Nyberg L, Li S-C, Lindenberger U, et al. Age-related differences in white matter microstructure: region-specific patterns of diffusivity. *Neuroimage.* 2010 Feb 1;49(3):2104–12.
- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 2007 Oct;18(10):1319–28.
- Cope O, Raker JW. Cushing's disease: the surgical experience in the care of 46 cases. *N Engl J Med.* 1955 Jul 28;253(4):119–127; contd.
- de Diego-Adeliño J, Pires P, Gómez-Ansón B, Serra-Blasco M, Vives-Gilabert Y, Puigdemont D, et al. Microstructural white-matter abnormalities associated with treatment resistance, severity and duration of illness in major depression. *Psychol Med.* 2014 Apr;44(6):1171–82.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun;6(6):463–75.
- Dorn LD, Burgess ES, Friedman TC, Dubbert B, Gold PW, Chrousos GP. The longitudinal course of psychopathology in Cushing's syndrome after correction of hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Mar;82(3):912-9.

- Dorn LD, Cerrone P. Cognitive function in patients with Cushing syndrome: a longitudinal perspective. *Clin Nurs Res*. 2000 Nov;9(4):420–40.
- Fallo F, Sonino N. Should we evaluate for cardiovascular disease in patients with Cushing's syndrome? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009 Dec;71(6):768–71.
- Fava M, Rankin MA, Wright EC, Alpert JE, Nierenberg AA, Pava J, et al. Anxiety disorders in major depression. *Compr Psychiatry*. 2000 Apr;41(2):97–102.
- Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci*. 2008 Jul;31(7):361–70.
- Forget H, Lacroix A, Somma M, Cohen H. Cognitive decline in patients with Cushing's syndrome. *J Int Neuropsychol Soc*. 2000 Jan;6(1):20–9.
- Forget H, Lacroix A, Cohen H. Persistent cognitive impairment following surgical treatment of Cushing's syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2002 Apr;27(3):367–83.
- Goosens KA, Sapolsky RM. Stress and Glucocorticoid Contributions to Normal and Pathological Aging. In: Riddle DR, editor. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms* [Internet]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007 [cited 2017 Jun 9]. (Frontiers in Neuroscience). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3870/>
- Gotch PM. Cushing's syndrome from the patient's perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1994 Sep;23(3):607–17.
- Guaraldi F, Salvatori R. Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. *J Am Board Fam Med*. 2012 Apr;25(2):199–208.

- Hammer GD, Tyrrell JB, Lamborn KR, Applebury CB, Hannegan ET, Bell S, et al. Transsphenoidal microsurgery for Cushing's disease: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6348–57.
- Haskett RF. Diagnostic categorization of psychiatric disturbance in Cushing's syndrome. *Am J Psychiatry.* 1985 Aug;142(8):911–6.
- Hatipoglu BA. Cushing's syndrome. *J Surg Oncol.* 2012 Oct 1;106(5):565–71.
- Herbert J, Goodyer IM, Grossman AB, Hastings MH, de Kloet ER, Lightman SL, et al. Do corticosteroids damage the brain? *J Neuroendocrinol.* 2006 Jun;18(6):393–411.
- Hsu J-L, Chen Y-L, Leu J-G, Jaw F-S, Lee C-H, Tsai Y-F, et al. Microstructural white matter abnormalities in type 2 diabetes mellitus: a diffusion tensor imaging study. *Neuroimage.* 2012 Jan 16;59(2):1098–105.
- Johansen-Berg H, Rushworth MFS. Using diffusion imaging to study human connective anatomy. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:75–94.
- Jones DK, Knösche TR, Turner R. White matter integrity, fiber count, and other fallacies: the do's and don'ts of diffusion MRI. *Neuroimage.* 2013 Jun;73:239–54.
- Kelly WF. Psychiatric aspects of Cushing's syndrome. *QJM.* 1996 Jul;89(7):543–51.
- Kerchner GA, Racine CA, Hale S, Wilhelm R, Laluz V, Miller BL, et al. Cognitive processing speed in older adults: relationship with white matter integrity. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e50425.

- Khiat A, Bard C, Lacroix A, Rousseau J, Boulanger Y. Brain metabolic alterations in Cushing's syndrome as monitored by proton magnetic resonance spectroscopy. *NMR Biomed.* 1999 Oct;12(6):357–63.
- Khiat A, Bard C, Lacroix A, Boulanger Y. Recovery of the brain choline level in treated Cushing's patients as monitored by proton magnetic resonance spectroscopy. *Brain Res.* 2000 Apr 17;862(1–2):301–7.
- Kim MJ, Whalen PJ. The structural integrity of an amygdala-prefrontal pathway predicts trait anxiety. *J Neurosci.* 2009 Sep 16;29(37):11614–8.
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology.* 1986 Nov;161(2):401–7.
- Le Bihan D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Jun;4(6):469–80.
- Loosen PT, Chambliss B, DeBold CR, Shelton R, Orth DN. Psychiatric phenomenology in Cushing's disease. *Pharmacopsychiatry.* 1992 Jul;25(4):192–8.
- Mancini T, Kola B, Mantero F, Boscaro M, Arnaldi G. High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Dec;61(6):768–77.
- Mancini T, Porcelli T, Giustina A. Treatment of Cushing disease: overview and recent findings. *Ther Clin Risk Manag.* 2010 Oct 21;6:505–16.

- Martignoni E, Costa A, Sinforiani E, Liuzzi A, Chiodini P, Mauri M, et al. The brain as a target for adrenocortical steroids: cognitive implications. *Psychoneuroendocrinology*. 1992 Aug;17(4):343–54.
- Mauri M, Sinforiani E, Bono G, Vignati F, Berselli ME, Attanasio R, et al. Memory impairment in Cushing's disease. *Acta Neurol Scand*. 1993 Jan;87(1):52–5.
- Mazet P, Simon D, Luton JP, Bricaire H. [Psychic symptoms and personality of 50 patients with Cushing's syndrome (author's transl)]. *Nouv Presse Med*. 1981 Sep 29;10(31):2565–70.
- Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Jun;17(4):144–9.
- Miljic P, Miljic D, Cain JW, Korbonits M, Popovic V. Pathogenesis of vascular complications in Cushing's syndrome. *Hormones (Athens)*. 2012 Mar;11(1):21–30.
- Minati L, Grisoli M, Bruzzone MG. MR spectroscopy, functional MRI, and diffusion-tensor imaging in the aging brain: a conceptual review. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2007 Mar;20(1):3–21.
- Modi S, Trivedi R, Singh K, Kumar P, Rathore RKS, Tripathi RP, et al. Individual differences in trait anxiety are associated with white matter tract integrity in fornix and uncinate fasciculus: preliminary evidence from a DTI based tractography study. *Behav Brain Res*. 2013 Feb 1;238:188–92.
- Momose KJ, Kjellberg RN, Kliman B. High incidence of cortical atrophy of the cerebral and cerebellar hemispheres in Cushing's disease. *Radiology*. 1971 May;99(2):341–8.

Newell-Price J. Cushing's syndrome. *Clin Med (Lond)*. 2008 Apr;8(2):204–8.

Nichols TE, Holmes AP. Nonparametric permutation tests for functional neuroimaging: a primer with examples. *Hum Brain Mapp*. 2002 Jan;15(1):1–25.

Nieman LK, Ilias I. Evaluation and treatment of Cushing's syndrome. *Am J Med*. 2005 Dec;118(12):1340–6.

Pereira AM, Tiemensma J, Romijn JA. Neuropsychiatric disorders in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology*. 2010;92 Suppl 1:65–70.

Rees DA, Hanna FWF, Davies JS, Mills RG, Vafidis J, Scanlon MF. Long-term follow-up results of transsphenoidal surgery for Cushing's disease in a single centre using strict criteria for remission. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 Apr;56(4):541–51.

Resmini E, Santos A, Gómez-Anson B, Vives Y, Pires P, Crespo I, et al. Verbal and visual memory performance and hippocampal volumes, measured by 3-Tesla magnetic resonance imaging, in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Feb;97(2):663–71.

Resmini E, Santos A, Gómez-Anson B, López-Mourelo O, Pires P, Vives-Gilabert Y, et al. Hippocampal dysfunction in cured Cushing's syndrome patients, detected by (1) H-MR-spectroscopy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Nov;79(5):700–7.

Sexton CE, Mackay CE, Ebmeier KP. A systematic review of diffusion tensor imaging studies in affective disorders. *Biol Psychiatry*. 2009 Nov 1;66(9):814–23.

- Sexton CE, Allan CL, Le Masurier M, McDermott LM, Kalu UG, Herrmann LL, et al. Magnetic resonance imaging in late-life depression: multimodal examination of network disruption. *Arch Gen Psychiatry*. 2012 Jul;69(7):680–9.
- Simmons NE, Do HM, Lipper MH, Laws ER. Cerebral atrophy in Cushing's disease. *Surg Neurol*. 2000 Jan;53(1):72–6.
- Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp*. 2002 Nov;17(3):143–55.
- Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, Johansen-Berg H, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage*. 2004;23 Suppl 1:S208-219.
- Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage*. 2006 Jul 15;31(4):1487–505.
- Smith SM, Nichols TE. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. *Neuroimage*. 2009 Jan 1;44(1):83–98.
- Sobrinho LG. Psychopathology in endocrine disorders: why so persistent after the cure? *Psychother Psychosom*. 2004 Apr;73(2):65–7.
- Song S-K, Sun S-W, Ramsbottom MJ, Chang C, Russell J, Cross AH. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage*. 2002 Nov;17(3):1429–36.

- Sonino N, Fava GA, Belluardo P, Girelli ME, Boscaro M. Course of depression in Cushing's syndrome: response to treatment and comparison with Graves' disease. *Horm Res.* 1993;39(5–6):202–6.
- Sonino N, Fava GA, Raffi AR, Boscaro M, Fallo F. Clinical correlates of major depression in Cushing's disease. *Psychopathology.* 1998 Dec;31(6):302–6.
- Sonino N, Fava GA. Psychiatric disorders associated with Cushing's syndrome. Epidemiology, pathophysiology and treatment. *CNS Drugs.* 2001;15(5):361–73.
- Sonino N, Navarrini C, Ruini C, Ottolini F, Paoletta A, Fallo F, et al. Persistent psychological distress in patients treated for endocrine disease. *Psychother Psychosom.* 2004 Apr;73(2):78–83.
- Sonino N, Ruini C, Navarrini C, Ottolini F, Sirri L, Paoletta A, et al. Psychosocial impairment in patients treated for pituitary disease: a controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 Nov;67(5):719–26.
- Sonino N, Fallo F, Fava GA. Psychosomatic aspects of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010 Jun;11(2):95–104.
- Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 2007 Mar;21(3):259–72.
- Starkman MN, Schteingart DE, Schork MA. Depressed mood and other psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: relationship to hormone levels. *Psychosom Med.* 1981 Feb;43(1):3–18.

- Starkman MN, Scheingart DE, Schork MA. Correlation of bedside cognitive and neuropsychological tests in patients with Cushing's syndrome. *Psychosomatics*. 1986 Jul;27(7):508–11.
- Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Scheingart DE. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry*. 1992 Nov 1;32(9):756–65.
- Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Scheingart DE. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry*. 1999 Dec 15;46(12):1595–602.
- Starkman MN, Giordani B, Berent S, Schork MA, Scheingart DE. Elevated cortisol levels in Cushing's disease are associated with cognitive decrements. *Psychosom Med*. 2001 Dec;63(6):985–93.
- Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Scheingart DE. Improvement in learning associated with increase in hippocampal formation volume. *Biol Psychiatry*. 2003 Feb 1;53(3):233–8.
- Starr AM. Personality changes in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1952 May;12(5):502–5.
- Trethowan WH, Cobb S. Neuropsychiatric aspects of Cushing's syndrome. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1952 Mar;67(3):283–309.
- van der Klaauw AA, Kars M, Biermasz NR, Roelfsema F, Dekkers OM, Corssmit EP, et al. Disease-specific impairments in quality of life during long-term follow-up of patients with different pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Nov;69(5):775–84.

- van der Werff SJA, Andela CD, Nienke Pannekoek J, Meijer OC, van Buchem MA, Rombouts SARB, et al. Widespread reductions of white matter integrity in patients with long-term remission of Cushing's disease. *Neuroimage Clin.* 2014;4:659–67.
- Wheeler-Kingshott CAM, Cercignani M. About “axial” and “radial” diffusivities. *Magn Reson Med.* 2009 May;61(5):1255–60.
- Whelan TB, Schteingart DE, Starkman MN, Smith A. Neuropsychological deficits in Cushing's syndrome. *J Nerv Ment Dis.* 1980 Dec;168(12):753–7.
- Whitlock, F. A. (1982). *Symptomatic affective disorders: a study of depression and mania associated with physical disease and medication.* Sydney: Academic Press

White Matter Alterations in the Brains of Patients with Active, Remitted, and Cured Cushing Syndrome: A DTI Study

P. Pires, A. Santos, Y. Vives-Gilabert, S.M. Webb, A. Sainz-Ruiz, E. Resmini, I. Crespo, M. de Juan-Delago, and B. Gómez-Anson



ABSTRACT

BACKGROUND AND PURPOSE: Cushing syndrome appears after chronic exposure to elevated glucocorticoid levels. Cortisol excess may alter white matter microstructure. Our purpose was to study WM changes in patients with Cushing syndrome compared with controls by using DTI and the influence of hypercortisolism.

MATERIALS AND METHODS: Thirty-five patients with Cushing syndrome and 35 healthy controls, matched for age, education, and sex, were analyzed through DTI (tract-based spatial statistics) for fractional anisotropy, mean diffusivity, axial diffusivity, and radial diffusivity (general linear model, family-wise error, and threshold-free cluster enhancement corrections, $P < .05$). Furthermore, the influence of hypercortisolism on WM DTI changes was studied by comparing 4 subgroups: 8 patients with Cushing syndrome with active hypercortisolism, 7 with Cushing syndrome with medication-remitted cortisol, 20 surgically cured, and 35 controls. Cardiovascular risk factors were used as covariates. In addition, correlations were analyzed among DTI values, concomitant 24-hour urinary free cortisol levels, and disease duration.

RESULTS: There were widespread alterations (reduced fractional anisotropy, and increased mean diffusivity, axial diffusivity, and radial diffusivity values; $P < .05$) in patients with Cushing syndrome compared with controls, independent of the cardiovascular risk factors present. Both active and cured Cushing syndrome subgroups showed similar changes compared with controls. Patients with medically remitted Cushing syndrome also had reduced fractional anisotropy and increased mean diffusivity and radial diffusivity values, compared with controls. No correlations were found between DTI maps and 24-hour urinary free cortisol levels or with disease duration.

CONCLUSIONS: Diffuse WM alterations in patients with Cushing syndrome suggest underlying loss of WM integrity and demyelination. Once present, they seem to be independent of concomitant hypercortisolism, persisting after remission/cure.

ABBREVIATIONS: AD = axial diffusivity; CS = Cushing syndrome; FA = fractional anisotropy; MD = mean diffusivity; RD = radial diffusivity; UFC = urinary free cortisol

Cushing syndrome (CS) is a rare endocrine disease with a prevalence of approximately 40 cases per million inhabitants,¹ in which diagnosis and, therefore, treatment are often delayed for months or years. It is caused by excessive cortisol exposure due to an adrenocorticotropin-secreting pituitary adenoma (Cushing disease), an adrenal adenoma, or an ectopic secretion of adreno-

corticotropin by tumors in other organs.² It causes a range of physical and psychological symptoms, including depression and apathy.³ The so-called glucocorticoid cascade hypothesis, based on animal models, associates the harmful effects of glucocorticoid excess on the structure, function, and vitality of brain cells.⁴ Excessive exposure to glucocorticoid leads to changes in plasticity, reduced neurogenesis, and cell loss in the hippocampus.⁵ Besides, cortisol induces myelin loss around axons in postnatal rats,⁶ and more recent evidence indicates that prolonged exposure to ele-

Received October 11, 2014; accepted after revision December 14.

From the Asociación para la Innovación en Análisis, Gestión y Procesamiento de Datos Científicos y Tecnológicos (P.P., A.S., Y.V.-G.), Barcelona, Spain; Departments of Endocrinology/Medicine (P.P., A.S., S.M.W., E.R., I.C.), Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, Instituto de Salud Carlos III, and Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; Port d'Informació Científica (Y.V.-G., A.S.-R.), Bellaterra, Barcelona, Spain; Institut de Física d'Altes Energies (A.S.-R.), Barcelona, Spain; and Neuroradiology Unit (M.d.J.-D., B.G.-A.), Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

This work was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, FIS080302 and FIS 070770), and the European Commission (ERCUSYN PHP800200).

Please address correspondence to: Beatriz Gómez-Ansón, MD, PhD, FRCR, Neuro-radiology Unit, Hospital Sant Pau, C/San Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; e-mail: BGomezA@santpau.cat

Indicates open access to non-subscribers at www.ajnr.org

Indicates article with supplemental on-line appendix and tables.

Indicates article with supplemental on-line photo.

Evidence-Based Medicine Level 2.

<http://dx.doi.org/10.3174/ajnr.A4322>

Demographic and clinical characteristics of healthy controls and patients with active, remitted, and cured CS^a

	Healthy Controls	Patients with Active CS	Patients with Remitted CS	Patients with Cured CS	F/ χ^2	P Value
Age (yr)	42.3 ± 10.4	41.9 ± 8.7	47.1 ± 10.0	41.4 ± 10.0	5.9	NS
Sex (M/F)	6:29	1:7	1:6	4:16	0.3	NS
Years of education	13.5 ± 3.4	14.4 ± 3.0	12.9 ± 2.3	13.4 ± 3.1	0.3	NS
24-Hour urinary free cortisol	133 ± 52	543 ± 307	152 ± 74	122 ± 75	26.3	<.001 ^b
Smoking status (nonsmoker/smoker/ex-smoker)	12/12/11	7/1/0	2/4/1	9/5/6	10.4	NS
Disease duration (mo)	NA	77.6 ± 77.4	44.6 ± 21.9	64.6 ± 34.0	0.99	NS
Origin (pituitary/adrenal/ectopic/AIMAH)	NA	5/3/0/0	3/2/1/1	17/2/0/0	10.8	NS
Hypertension (no/yes)	35/0	4/4	3/4	13/7	20.9	<.001 ^c
Hypercholesterolemia (no/yes)	31/4	7/1	7/0	17/3	1.2	NS
Hypertriglyceridemia (no/yes)	29/6	6/2	3/4	9/11	10.5	.015 ^d
Central obesity (no/yes)	25/10	2/6	0/7	9/11	15.6	.001 ^e
Body mass index ^g (no/overweight/obesity)	22/11/2	2/5/1	1/3/3	8/9/3	12.6	.049 ^f

Note:—NS indicates not significant; AIMAH, ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia.

^a Data are expressed as mean ± SD.

^b Healthy controls vs active CS (<.001); active CS vs remitted CS (<.001); active CS vs cured CS (<.001).

^c Healthy controls vs active CS (<.001); healthy controls vs remitted CS (<.001); healthy controls vs cured CS (<.001).

^d Healthy controls vs remitted CS (.043); healthy controls vs cured CS (.006).

^e Healthy controls vs active CS (.015); healthy controls vs remitted CS (.001).

^f Healthy controls vs remitted CS (.015).

^g Body mass index: normal, ≤25; overweight, 25–30; obesity, >30.

vated glucocorticoid may alter oligodendrocyte-mediated myelination.^{7,8} Thus, cortisol excess most likely alters the microstructure of cerebral white matter, targeting the myelinated axonal tracts in the brains of patients with CS. Moreover, hypercortisolism frequently determines diabetes mellitus, central obesity, and thrombophilia, which increase cardiovascular disease,⁹ the main cause of mortality in CS, even after biochemical cure.¹⁰ These comorbidities may also affect cerebral WM microstructure in CS.¹¹

A few imaging studies have investigated brain structures in patients with CS.^{12,13} Starkman et al,¹⁴ using MR imaging, found a relationship among hippocampal volume reduction, memory dysfunction, and elevated cortisol levels in CS. More recent studies, including CT and MR imaging, have described loss of brain volume in CS.¹⁵ With MR imaging and automated volumetry, hippocampal volume reductions were found in patients with CS with severe memory deficits.¹⁶ A more recent study investigated WM with DTI in patients in long-term remission of Cushing disease and observed widespread abnormalities. The authors also observed a loss of integrity of the uncinate fasciculus, which was related to the severity of depression.¹⁷ They concluded that structural changes in WM integrity in the brain persisted after hypercortisolism cure¹⁷; but patients with active disease were not included, and cardiovascular risk factors were not reported.

DTI is an MR imaging technique that allows noninvasive, in vivo study of the brain by assessing the motion of water molecules along and across neural axons.^{18,19} Different DTI maps show the WM architecture²⁰ and can depict microstructural WM abnormalities. Fractional anisotropy (FA) reflects WM integrity, while increases in mean diffusivity (MD) may be caused by demyelination or edema.²¹ Decreases in axial diffusivity (AD) indicate axonal loss,²² while increased radial diffusivity (RD) is related to demyelination.²¹

The aim of this study was to investigate cerebral WM microstructure in patients with CS compared with healthy controls by using DTI. It was hypothesized that WM integrity in the brain of patients with CS was altered, reflecting microstructural changes, and that these alterations persisted after remission or cure of hypercortisolism.

A first DTI analysis was performed comparing patients with CS with healthy controls, followed by a second analysis in which patients were separated into active CS, remitted CS, and cured CS. Comorbidities known to increase cardiovascular risk were investigated as covariates. Correlations of WM changes with 24-hour urinary free cortisol (UFC) values and the duration of hypercortisolism were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Participants

Thirty-five patients with CS and 35 healthy control volunteers matched for sex, age (±3 years), and years of education (±3 years) were included. Eight patients had active hypercortisolism, 7 had remitted hypercortisolism on medical therapy, and 20 were cured after surgery (Table). Remission of hypercortisolism was considered when patients achieved adrenal insufficiency or morning cortisol suppression (<50 nmol/L, <1.8/μg/dL) after 1 mg dexamethasone overnight and had repeatedly normal 24-hour UFC levels (<280 nmol/24 hours). Disease duration, 24-hour UFC levels, and clinical variables related to cardiovascular risk (smoking, hypertension, dyslipidemia, central obesity, and increased body mass index) were collected (Table). Disease duration was defined by the endocrinologist in charge as the time from symptom onset until remission of hypercortisolism after treatment. At diagnosis, duration of hypercortisolism was estimated by personal interview and detailed review of medical records and photographs of patients. All information was written or kept in clinical records, together with biochemical data. Patients with diabetes mellitus were excluded because it is known to affect WM.²³

All subjects were right-handed and signed an informed consent after approval of the study by the ethics committee of the hospital. No subject had brain injury or clinical cerebrovascular disease.

Image Processing

DTI processing was performed at the computing of Port d'Informació Científica in Barcelona through a designed, portal-based platform, including fMRI of the Brain Software Library

(FSL; Version 4.1.4; <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl>).²⁴ Images were first corrected for head motion and eddy currents by an affine registration. The first 3D volume was extracted as the image reference by using the Brain Extraction Tool (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/BET>).²⁵ Voxelwise images of FA, MD, AD, and RD maps were generated by using the fMRI of the Brain Diffusion Toolbox (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fdt/index.html>) by fitting diffusion tensors at each voxel. Next, the tract-based spatial statistics package (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/TBSS>)²⁶ was applied for a voxelwise statistical analysis. First, the fMRI of the Brain Linear Image Registration Tool (FLIRT; <http://www.fmrib.ox.ac.uk/>) was used to align all FA images into a standard space (fMRI of the Brain 58-FA). Then, a mean skeleton of all FA images was built by selecting the main WM tracts, thinned with a 0.2 threshold value (excluding all FA voxels of <0.2) to increase consistency. MD, AD, and RD maps followed the same Tract-Based Spatial Statistics procedure of nonlinear warps and skeleton projection to obtain estimated vectors for each.

MR imaging acquisition and statistical analysis are detailed in the On-line Appendix.

RESULTS

Analysis 1: Comparison between Patients with CS and Controls

Demographic and Clinical Variables. Because of the matched study design, no differences in age, sex, or years of education between patients with CS and controls were present. Differences were found for comorbidities: hypertension (0 controls/15 patients with CS; $P < .001$), hypertriglyceridemia (6 controls/17 patients with CS; $P = .004$), central obesity (10 controls/24 patients with CS; $P < .001$), and body mass index (22, healthy, <25; 11 overweight, between 25 and 30; and 2 obese, >30 controls versus 11 healthy, 17 overweight, and 7 obese patients with CS; $P = .019$). To correct for these differences, we included these comorbidities as covariates in the DTI analysis. No differences in smoking (12 nonsmokers, 12 smokers, and 11 ex-smokers among controls versus 18 nonsmokers, 10 smokers, and 7 ex-smokers in patients with CS) or in the prevalence of hypercholesterolemia (4 healthy controls versus 4 patients with CS) were observed between groups.

DTI Analysis

The Figure shows widespread FA decreases (A) and MD (B), AD (C), and RD (D) increases in all patients with CS compared with controls ($P < .05$). No differences were found in the reverse comparisons (ie, controls had neither lower FAs nor higher MD, AD, or RDs than patients with CS).

Analysis 2: Comparison between Patients with Active, Remitted, and Cured CS and Controls

Demographic and Clinical Characteristics. No differences were found in age, sex, or years of education between controls and any of the CS subgroups. Twenty-four-hour UFC levels in patients with active CS were higher than in those in the other 3 groups. The prevalence of hypertension, hypertriglyceridemia, central obesity, and increased body mass index differed among groups, so they

were analyzed as covariates in DTI analysis (Table). Smoking and hypercholesterolemia did not differ among groups. No differences in disease duration or etiology among the CS groups were found.

DTI Analysis

On-line Fig 1 shows voxels/regions having decreased FA (A) and increased MD (B), AD (C), and RD (D) values in patients with active CS compared with controls ($P < .05$). No differences were found in the reverse contrasts (ie, controls had neither lower FA nor higher MD, AD, or RD values than patients with active CS).

On-line Fig 2 shows voxels/regions having decreased FA (A) and increased MD (B) and RD (C) values ($P < .05$) in patients with remitted CS compared with controls. No differences were found in the reverse contrasts (ie, controls had neither lower FA nor higher MD or RD values than patients with active CS). No differences in AD values among groups were seen.

On-line Fig 3 shows voxels/regions having decreased FA (A) and higher MD (B), AD (C), and RD (D) values ($P < .05$) in patients with cured CS compared with controls. No differences were found in the reverse contrasts (ie, controls had neither lower FA nor higher MD, AD, or RD values than patients with cured CS).

No differences were found in any DTI maps/values (FA, MD, AD, or RD) among the 3 subgroups of patients with CS (active, remitted, and cured).

Correlation Analysis

No correlations were found for any DTI maps (FA, MD, AD, and RD) with the 24-hour UFC levels of healthy controls ($n = 28$) or patients with CS ($n = 34$) or with disease duration in patients with CS.

DISCUSSION

This study demonstrates widespread WM alterations on DTI in the brains of patients with CS compared with healthy controls, which persist after controlling for cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, and obesity). The pattern of WM involvement, with decreased FA and increased MD, AD, and RD, suggests an underlying loss of WM integrity and predominant demyelination. The subgroup analysis demonstrates this same pattern of WM involvement in patients with active, remitted, and cured CS, without any correlation among DTI values, concomitant 24-hour UFC levels, or disease duration. These results imply that WM damage does not depend on current hypercortisolism because it persists after remission/cure of CS. These findings support the recent concept that once WM damage has occurred after early exposure to hypercortisolism, it is not completely reversible, despite successful treatment with surgery or medical therapy. It adds to the growing body of evidence that residual morbidity persists after endocrine control of CS.¹⁷

Although most DTI studies refer to FA values, the other DTI maps/parameters provide additional information on WM microstructure that expands the understanding of WM integrity. Reduced FA values indicate loss of fiber coherence and therefore of WM integrity. An increase in overall water diffusion in all directions (MD) may reflect demyelination²⁷ or edema²¹; more specif-

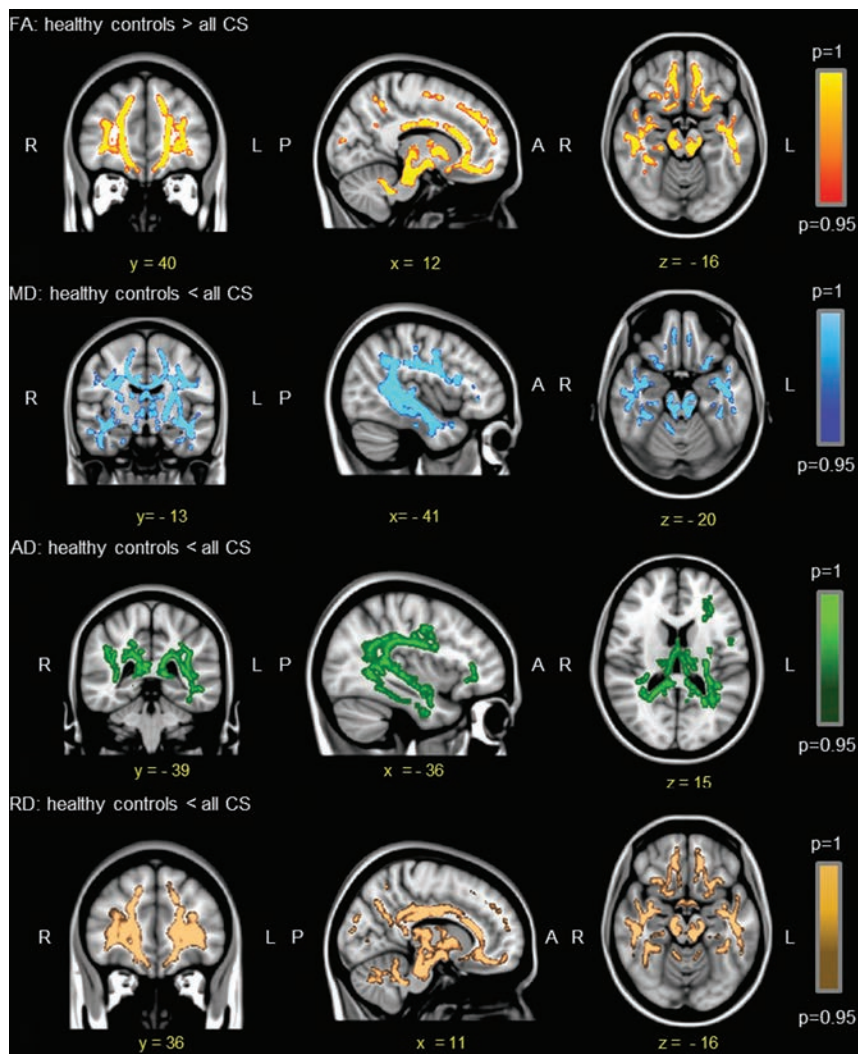


FIGURE. Differences ($P < .05$) in DTI maps among all patients with CS and controls by using hypertension, hypertriglyceridemia, central obesity, and body mass index as covariates.

ically, radial diffusivity measures diffusion perpendicular to the tract and relates to myelin sheath integrity,²⁸ so it is increased in demyelination.^{21,29} The overall local magnitude of diffusion parallel to the tract (axial diffusivity) provides information on axonal integrity, so reduced AD values indicate axonal loss.²² Nevertheless, any microstructural features of WM inferred from DTI maps are indirect measures of the real biologic structure and should be interpreted with caution.^{30,31}

Our study demonstrates widespread WM damage throughout the brains of patients with CS, with reduced FA and increased diffusivities, including RD, which persist after controlling for cardiovascular risk factors and clinical variables that may also alter WM (including hypertension, dyslipidemia, and obesity). These microstructural changes in the WM of patients with CS reflect loss of integrity mainly due to demyelination but not to axonal loss. Our results are similar to those obtained in a recent DTI study of 22 patients with CS in long-term remission (11 years) after surgery, by using a similar DTI methodology.¹⁷ These authors reported findings similar to ours, with patients with CS having widespread reduced FA values in WM, including the corpus callosum, bilateral cingulate gyrus, and bilateral uncinate fasciculus.

They also found increased RD values, similar to our results, indicating predominant underlying demyelination in altered WM tracts. The observed increases in RD should, nevertheless, be interpreted with caution, especially in regions containing white matter tract crossings, as has been previously reported.³¹ Our results expand the findings not only to patients in long-term remission but also in those with active hypercortisolism and those with remitted CS on medical therapy. Furthermore, cardiovascular risk factors, which may also damage the brain WM, were controlled for in our study. Evidence indicates that glucocorticoid may contribute to brain aging⁵ and produce WM changes on DTI³² similar to those found in CS. The pattern of WM involvement in aging has been termed “chronic WM degeneration” and includes increased extracellular volume (edema) and lower membrane attenuation as a consequence of myelin loss, smaller axonal ratio volume, higher axonal interspace, and reductions in extracellular tortuosity.³³ These microstructural WM changes are similar to the DTI changes observed in patients with CS in our study.

Some studies have reported a certain degree of reversibility of brain³⁴ and hippocampal volume loss³⁵ after hypercortisolism correction. However, metabolic abnormalities in the hippocampi of patients with cured CS, namely persistent neuronal dysfunction/loss and glial proliferation, have recently been observed,³⁶ which agree with the DTI alterations we have now observed in patients with remitted and cured CS. Most interesting, it has been suggested that chronic exposure to glucocorticoid in the central nervous system could cause inflammation,³⁷ which may trigger WM microstructure damage in patients with CS, as found in the present study. Moreover, high cortisol levels are known to increase the prevalence of cardiovascular risk factors^{9,11} such as hypertension, dyslipidemia, and obesity, which could also affect WM microstructure. Therefore, we corrected for these cardiovascular risk factors, which differed among groups of patients with CS; but WM damage was observed independent of the existence or absence of these comorbidities. We excluded patients and controls with diabetes, another disease known to damage brain WM. Our results lead us to hypothesize that exposure to hypercortisolism plays the major role, possibly mediated by inflammation,³⁷ and is responsible for the persistence of WM damage in remitted/cured patients with CS.³⁸

Our study has some limitations: first, the small sample of subjects included, which is difficult to overcome in a rare endocrine

disease like CS. Compared with controls, patients with remitted CS showed decreased FA and increased MD and RD only, with no changes in AD, these results being different from those observed in patients with active and cured CS; this lack of change in AD may be due to the small sample size. Second, the DTI study, although methodologically robust, is cross-sectional and includes patients with CS in different stages of the disease (active, remitted, and cured). To clearly define the influence of hypercortisolism on WM alterations, larger longitudinal studies are desirable. Finally, our study did not address the functional significance of WM alterations and whether they relate to psychology.

CONCLUSIONS

WM damage on DTI in the brains of patients with CS suggests widespread integrity loss and predominant demyelination. These alterations seem to be independent of concomitant hypercortisolism and the presence or absence of other cardiovascular risk factors like hypertension, dyslipidemia, and obesity, and they persist despite remission/cure. When they occur and the mechanisms and the potential modifiers involved remain unclear.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank patients and healthy volunteers who participated in the current study for their kind cooperation.



Disclosures: Patricia Pires—RELATED: Grant: Spanish Ministry of Science and Innovation (FIS080302, FIS 070770).* Alicia Santos—RELATED: Grant: Ministerio de Ciencia y educación.* Comments: Public Spanish grant FIS080302. Susan M. Webb—RELATED: Grant: Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness, and Ministry of Health, Spain.* Comments: This was a public competitive grant for which I am the principal investigator. Eugenia Resmini—RELATED: Grant: Ministerio de Ciencia e Innovacion (FIS 080302).* Iris Crespo—RELATED: Grant: FIS 080302 "Neuroradiological, Neuropsychological and Clinical Study in Endogenous Hypercortisolism: Comparison between Cushing's Syndrome and Chronic Major Depressive Disorder"; funding agency: Instituto de Salud Carlos III; duration of the project: from 2009 to 2011, Principal Investigator: Susan M. Webb. *Money paid to the institution.

REFERENCES

- Newell-Price J. **Cushing's syndrome.** *Clin Med* 2008;8:204–08
- Hatipoglu BA. **Cushing's syndrome.** *J Surg Oncol* 2012;106:565–71
- Guaraldi F, Salvatori R. **Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease.** *J Am Board Fam Med* 2012;25:199–208
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. **The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis.** *Endocr Rev* 1986;7:284–301
- Goosens KA, Sapolsky RM. **Stress and glucocorticoid contributions to normal and pathological aging.** In Riddle DR, ed. *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms.* Boca Raton: CRC Press; 2007:305–22
- Bohn MC, Friedrich VL Jr. **Recovery of myelination in rat optic nerve after developmental retardation by cortisol.** *J Neurosci* 1982;2:1292–98
- Alonso G. **Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain.** *Glia* 2000;31:219–31
- Miyata S, Koyama Y, Takemoto K, et al. **Plasma corticosterone activates SGK1 and induces morphological changes in oligodendrocytes in corpus callosum.** *PLoS One* 2011;6:e19859
- Fallo F, Sonino N. **Should we evaluate for cardiovascular disease in patients with Cushing's syndrome?** *Clin Endocrinol* 2009;71:768–71
- Aulinas A, Valassi E, Webb SM. **Prognosis of patients treated for Cushing syndrome.** *Endocrinol Nutr* 2014;61:52–61
- Miljic P, Miljic D, Cain JW, et al. **Pathogenesis of vascular complications in Cushing's syndrome.** *Hormones (Athens)* 2012;11:21–30
- Trethowan WH, Cobb S. **Neuropsychiatric aspects of Cushing's syndrome.** *AMA Arch Neurol Psychiatry* 1952;67:283–309
- Cope O, Raker JW. **Cushing's disease: the surgical experience in the care of 46 cases.** *N Engl J Med* 1955;253:119–27
- Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, et al. **Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome.** *Biol Psychiatry* 1992;32:756–65
- Simmons NE, Do HM, Lipper MH, et al. **Cerebral atrophy in Cushing's disease.** *Surg Neurol* 2000;53:72–76
- Resmini E, Santos A, Gómez-Anson B, et al. **Verbal and visual memory performance and hippocampal volumes, measured by 3-Tesla magnetic resonance imaging, in patients with Cushing's syndrome.** *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:663–71
- van der Werff SJ, Andela CD, Nienke Pannekoek J, et al. **Widespread reductions of white matter integrity in patients with long-term remissions of Cushing's disease.** *Neuroimage Clin* 2014;4:659–67
- Johansen-Berg H, Rushworth MF. **Using diffusion imaging to study human connective anatomy.** *Annu Rev Neurosci* 2009;32:75–94
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al. **MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders.** *Radiology* 1986;161:401–07
- Le Bihan D. **Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI.** *Nat Rev Neurosci* 2003;4:469–80
- Alexander AL, Lee JE, Lazar M, et al. **Diffusion tensor imaging of the brain.** *Neurotherapeutics* 2007;4:316–29
- Budde MD, Xie M, Cross AH, et al. **Axial diffusivity is the primary correlate of axonal injury in the experimental autoimmune encephalomyelitis spinal cord: a quantitative pixelwise analysis.** *J Neurosci* 2009;29:2805–13
- Hsu JL, Chen YL, Leu JG, et al. **Microstructural white matter abnormalities in type 2 diabetes mellitus: a diffusion tensor imaging study.** *Neuroimage* 2012;59:1098–105
- Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, et al. **Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL.** *Neuroimage* 2004;23(suppl 1):S208–19
- Smith SM. **Fast robust automated brain extraction.** *Hum Brain Mapp* 2002;17:143–55
- Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, et al. **Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data.** *Neuroimage* 2006;31:1487–505
- Horsfield MA, Jones DK. **Applications of diffusion-weighted and diffusion tensor MRI to white matter diseases: a review.** *NMR Biomed* 2002;15:570–77
- Beaulieu C. **The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system: a technical review.** *NMR Biomed* 2002;15:435–55
- Song SK, Yoshino J, Le TQ, et al. **Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain.** *Neuroimage* 2005;26:132–40
- Wheeler-Kingshott CA, Cercignani M. **About "axial" and "radial" diffusivities.** *Magn Res Med* 2009;61:1255–60
- Jones DK, Knösche TR, Turner R. **White matter integrity, fiber count, and other fallacies: the do's and don'ts of diffusion MRI.** *Neuroimage* 2013;73:239–54
- Minati L, Grisoli M, Bruzzone MG. **MR spectroscopy, functional MRI, and diffusion-tensor imaging in the aging brain: a conceptual review.** *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2007;20:3–21
- Burzynska AZ, Preuschhof C, Bäckman L, et al. **Age-related differences in white matter microstructure: region-specific patterns of diffusivity.** *Neuroimage* 2010;49:2104–12

34. Bourdeau I, Bard C, Noël B, et al. **Loss of brain volume in endogenous Cushing's syndrome and its reversibility after correction of hypercortisolism.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1949–54
35. Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, et al. **Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease.** *Biol Psychiatry* 1999;46:1595–602
36. Resmini E, Santos A, Gómez-Anson B, et al. **Hippocampal dysfunction in cured Cushing's syndrome patients, detected by (1) H-MR-spectroscopy.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;79:700–07
37. Sorrells, Sapolsky RM. **An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS.** *Brain Behav Immun* 2007;21:259–72
38. Barahona MJ, Sucunza N, Resmini E, et al. **Persistent body fat mass and inflammatory marker increases after long-term cure of Cushing's syndrome.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3365–71

White matter involvement on DTI-MRI in Cushing's syndrome relates to mood disturbances and processing speed: a case-control study

Patricia Pires^{1,2} · Alicia Santos^{2,3} · Yolanda Vives-Gilabert^{1,4} · Susan M. Webb^{2,3}  · Aitor Sainz-Ruiz^{4,5} · Eugenia Resmini^{2,3} · Iris Crespo^{2,3} · Manel de Juan-Delago⁶ · Beatriz Gómez-Anson⁶ 

Published online: 22 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract

Purpose Cushing's syndrome (CS) is an endocrine disorder due to prolonged exposure to cortisol. Recently, microstructural white matter (WM) alterations detected by diffusion tensor imaging (DTI) have been reported in CS patients, and related to depression, but other functional significances remain otherwise unclear. We aimed at investigating in more depth mood symptoms in CS patients, and how these relate to cognition (information processing speed), and to WM alterations on DTI.

Methods The sample comprised 35 CS patients and 35 healthy controls. Beck Depression Inventory-II (BDI-II) was used to measure depressive symptoms, State-Trait Anxiety Inventory (STAI) to assess anxiety, and processing speed was measured by the Symbol Digit Modalities Test (SDMT). DTI studies were acquired using a 3-Tesla Philips-Achieva MR-facility. Voxelwise statistical analysis of fractional anisotropy (FA), mean, axial and radial

diffusivities (MD, AD, RD) data were performed using FMRIB Software Library. Correlation analysis were obtained between mood and processing speed variables, and FA, MD, AD and RD values, taking both CS patients and healthy controls.

Results Active, controlled and cured CS patients showed greater depression ($F=12.4$, $p<0.001$), anxious state ($F=4.8$, $p=0.005$) and anxious trait ($F=9.6$, $p<0.001$) scores, than controls. Using the entire sample, depression scores correlated negatively to FA and positively to RD values. Although there were no differences in processing speed between groups, SDMT scores correlated positively to both FA and AD values.

Conclusions There were greater depressive and anxious symptoms in CS patients than in healthy controls, but no difference in processing speed. However, DTI is related to depression and information processing speed in CS.

Keywords Cushing syndrome · Depression · Anxiety · DTI · Brain white matter

✉ Beatriz Gómez-Anson
BGomezA@santpau.cat

- ¹ INNACYT, CR Laureà Miró, 107, Sant Feliu de Llobregat, Barcelona, Spain
- ² Endocrinology/Medicine Departments, Hospital Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain
- ³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER, Unidad 747), ISCIII and Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain
- ⁴ Port d'Informació Científica (PIC), Campus UAB Edifici D, Bellaterra, Barcelona, Spain
- ⁵ Institut de Física d'Altes Energies (IFAE), Campus UAB Edifici C, Bellaterra, Barcelona, Spain
- ⁶ Neuroradiology Unit, Hospital Sant Pau, IIB-Sant Pau, and UAB, C/ San Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

Background

Cushing's syndrome (CS) is a rare endocrine disease characterized by hypercortisolism caused by a pituitary or an adrenal adenoma or less frequently by ectopic ACTH secretion from a variety of tumors [1]. This endogenous hypercortisolism determines endocrine, cognitive and psychiatric symptoms [2].

CS has long been related to neuropsychological and mood disturbances [3]. More recent studies evidenced major depression in at least half of the patients with CS [4]. Loosen and colleagues [5] described an anxious-depressive syndrome in patients with active pituitary

Cushing's disease. Neurocognitive impairment has been also described in CS, together with brain abnormalities on imaging, mainly cerebral atrophy [6]. A recent systematic review reported structural brain abnormalities, neurochemical and functional disturbances in patients with CS, even after long term remission [7].

Diffusion tensor imaging (DTI) is a magnetic resonance imaging (MRI) technique, which allows mapping brain regions/components on MRI by the motion of circulating water molecules. Due to the diversity of components in the brain, the molecules do not diffuse equally and collide with obstacles as membranes and myelinated axons, and help in defining their shape, size and microstructural state. Low fractional anisotropy (FA) reflects loss of WM integrity due to decreases in axial diffusivity (AD), which indicates axonal loss [8], and/or increases in radial diffusivity (RD), is more related to demyelination. Mean diffusivity (MD), another DTI value, increases in demyelination or edema [9].

In a recent DTI study, we reported a widespread pattern of WM alterations with FA reductions, MD and RD increases and partial AD increases, in the brain of CS patients compared to healthy controls, which seemed to be independent from cardiovascular risk factors and clinical variables such as hypertension, dyslipidemia or obesity [10]. This pattern of WM involvement in the brain of CS patients suggested underlying loss of WM integrity and demyelination, and seemed to persist despite endocrine remission/cure. Another recent study also reported altered FA values in the uncinate fasciculus of CS patients, which were related to depression [11]. Apart from this limited evidence, the functional (psychiatric/cognitive) significance of WM alterations on DTI in the brain of CS patients remains otherwise unknown.

Our aim was to further investigate mood disturbances in CS patients, and their relationship to WM alterations on DTI. We hypothesized that mood disturbances in CS patients would be greater than in controls, and related to widespread WM alterations on DTI. As WM is composed of myelinated axons, the thickness and sheath of which are related to nerve conduction velocity and thus to processing speed [12], we additionally hypothesized that there may be abnormalities in information processing speed in CS patients, also possibly related to mood and WM alterations.

Methods

Subjects

The study included 35 patients with CS and 35 healthy controls matched for sex, age (± 3 years) and years of education (± 3 years). CS patients were divided into three groups:

Group 1 = 8 with hypercortisolism (active CS) having currently elevated 24-h UFC levels, group 2 = 7 controlled CS patients on medical therapy having normal 24-h UFC levels and group 3 = 20 cured (previous successful surgery) CS patients with either normal (16 patients) or low (4 patients) 24-h UFC levels. In this cured group, the study was performed 72.8 ± 83 months after surgery. One patient with TSH deficiency was on substitution treatment with L-thyroxine; there were no other pituitary deficiencies. Interval between surgery and MRI in the patients cured after surgery was 72.8 ± 83 months.

One patient in the active CS group and one in the controlled CS group relapsed after initially successful surgery. Two CS patients with active hypercortisolism were on medical therapy with metyrapone (Mtp), one with ketoconazole (Ktz), one with cabergoline and four were untreated. Among the controlled CS patients, three were on Ktz, two on Mtp, one on both Ktz and Mtp and one on cabergoline. Five cured CS patients with adrenal insufficiency and low 24-h UFC levels were treated with hydrocortisone.

CS was considered cured when patients achieved adrenal insufficiency or showed a morning cortisol suppression (< 50 nmol/l; < 1.8 μ g/dl) after 1 mg dexamethasone overnight and repeatedly normal 24-h UFC (measured with a commercial RIA after a previous urine extraction with an organic solvent; normal < 280 nmol/24 h). We excluded all subjects with previous head injury, cerebrovascular disease, diabetes mellitus and growth hormone deficiency, known to interfere with DTI results [13]. Previous psychiatric illness was an exclusion criterion for healthy controls. All subjects were right-handed and signed an informed consent after approval of the study by the Hospital's Ethics Committee.

Neuropsychiatric/neuropsychological examination

The following tests were used:

Beck Depression Inventory II (BDI-II) is a self-administered questionnaire composed of 21 items to measure attitudes, symptoms, and feelings of depression in the past 2 weeks [14]. Items refer to depressive characteristics as loss of energy, change in sleep patterns, irritability, change in appetite, concentration difficulties, tiredness and/or fatigue, and loss of interest in sex. Each item contains four alternative responses arranged from lowest to highest severity of depressive symptoms. The total score is classified in six levels of depression, ranging from a state considered as minimal depression (0–13), through mild depression (14–19), moderate depression (20–28), to severe depression (29–63).

State-Trait Anxiety Inventory (STAI) is a self-administered test, which evaluates the presence and severity of anxiety. It comprises two subscales: the State-anxiety scale with 20 items, which assesses the presence and intensity

of current anxiety symptoms, and the Trait-anxiety scale, which includes 20 items relating to the propensity of anxiety as a general trait. Results indicate the presence of anxiety and its type of prevalence: state/trait. Total scores range from 0 to 60, describing the presence or absence of anxiety on a three point scale (0–3) from none through mild, and moderate, to the most extreme state, and trait. Higher scores are indicative of greater anxiety.

Symbol Digit Modalities Test (SDMT) is a sustained attention test which assesses information processing speed [15], and consists on replacing a series of numbers instead of their corresponding symbols by responding as quickly as possible within 90 s. It evaluates the total replaced items in these 90 s, this value representing a measurement of the speed each subject needs for processing information. The oral form carried out in this study allows removing those motor effects involved in the written version. All participants were examined by a trained neuropsychologist (A.S.).

MRI and DTI acquisition

MRI and DTI studies were acquired using a 3 T Philips-Achieva MR facility (software version 2.1.3.2) at Hospital Sant Pau in Barcelona. Seventy sensitivity-encoded (SENSE) single-shot echo-planar images (EPI) were obtained with the following parameters: echo time (TE)=60 ms, repetition time (TR)=8166 ms, slice thickness=2 mm, voxel dimensions=1.75×1.75×2 mm, field of view (FOV)=100 mm, image dimensions=128×128×60, acquisition matrix=112, number of slices=1020. A 4D study with 15 diffusion direction volumes at 800 s/mm² b-values and a first reference volume without diffusion weighting at 0 s/mm², were thus obtained in each subject.

Image processing

DTI processing was carried out with the FMRIB Software Library (FSL v 4.1.4) [16] using the PICNIC web portal [17] at the cluster of Port d'Informació Científica (PIC)

in Barcelona. The FMRIB Diffusion Toolbox (FDT) was used for each the scanner of each subject, applying eddy current correction, which corrects for distortions from the gradient field and head motion. Non-diffusion weighted volume (b=0) was extracted by using the brain extraction tool (BET) [18] in order to apply dtfit and construct voxel-wise images through local fitting of diffusion tensors. Thereafter, the tract-based spatial statistics (TBSS) package [19] was applied by using the FSL Non-Linear Image Registration Tool (FNIRT) which aligned all FA images in a standard space (FMRIB58-FA) and then a mean of all FA was constructed. Main fibers of WM were selected from the mean FA, drawing a skeletonized map thinned to 0.2 (voxels with lower FA intensity values were removed). Finally, all FA maps were also skeletonized for further analysis and comparisons. The same procedure was performed with non-FA maps (MD, AD and RD) on their own estimated vectors.

Statistical analysis

Differences in neuropsychiatry/neuropsychology, clinical, and demographic variables between active, controlled and cured CS patients, and healthy controls, were searched for using the IBM SPSS 20 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and an ANOVA with Tukey post-hoc method for quantitative variables, and χ^2 for categorical variables.

Voxel-wise statistical analysis was performed through a general lineal model (GLM) design and non-parametric statistics for correlations. A family wise error (FWE) correction for multiple comparisons and the Threshold-free cluster-enhanced corrected (TFCE) were also used, and significance was defined at $p < 0.05$ [20].

Correlation analyses were also performed between the mean of the significant voxels observed on DTI maps and neuropsychiatric/cognitive tests using Pearson's correlation coefficient and SPSS.

Table 1 Demographic variables

	Healthy controls	Active CS patients	Controlled CS patients	Cured CS patients	F/ χ^2	p value
Age	42.3±10.4	41.9±8.7	47.1±10.0	41.4±10.0	5.9	NS
Gender (M/F)	6/29	1/7	1/6	4/16	0.3	NS
Years of education	13.5±3.4	14.4±3.0	12.9±2.3	13.4±3.1	0.3	NS
Disease duration (months)	–	77.6±77.4	44.6±21.9	66.6±34	0.99	NS

Data are expressed as mean ± SD

Results

There were no differences between groups in age, gender, years of education or disease duration (Table 1). Neuropsychiatry showed higher BDI-II scores in controlled, active and cured CS patients than in healthy controls, indicating that CS had more depressive symptoms ($p < 0.001$). The STAI-State was also higher in all CS groups (active, controlled and cured) compared to healthy controls, this indicating more anxiety in CS patients. Likewise, the STAI-Trait also showed greater anxiety scores in active and cured CS patients compared to healthy controls. On the contrary, there were no differences in SDMT performances between

any of the CS patients and controls, which indicated no statistically significant difference in processing speed in this cohort of CS patients (Table 2).

Correlations neuropsychiatry/neuropsychological evaluations and DTI

BDI-II scores correlated negatively with FA values in the following brain regions: right corticospinal tract (CST), forceps major, forceps minor, left inferior fronto-occipital fasciculus (IFOF) (frontal part), right IFOF, right inferior longitudinal fasciculus (ILF), left superior longitudinal fasciculus (SLF) (anterior part) and right SLF (Fig. 1a),

Table 2 Neuropsychiatry/neuropsychological testing

	Healthy controls	Active CS patients	Controlled CS patients	Cured CS patients	F/ χ^2	p value	Post-hoc ^a
BDI-II	3.2 ± 3.4	10.4 ± 2.9	8.9 ± 5.3	10.50 ± 6.9	12.4	<0.001	1
STAI-State	11.4 ± 7.2	22.7 ± 10.2	17.4 ± 10.5	18.9 ± 11.8	4.8	0.005	2
STAI-Trait	13.2 ± 7.2	25.7 ± 7.8	24.0 ± 12.4	24.3 ± 10.5	9.6	<0.001	3
Symbol Digit Modalities Test	61.7 ± 8.8	61.5 ± 9.6	55.4 ± 10.6	63.6 ± 10.0	1.3	0.267	

Data are expressed as mean ± SD

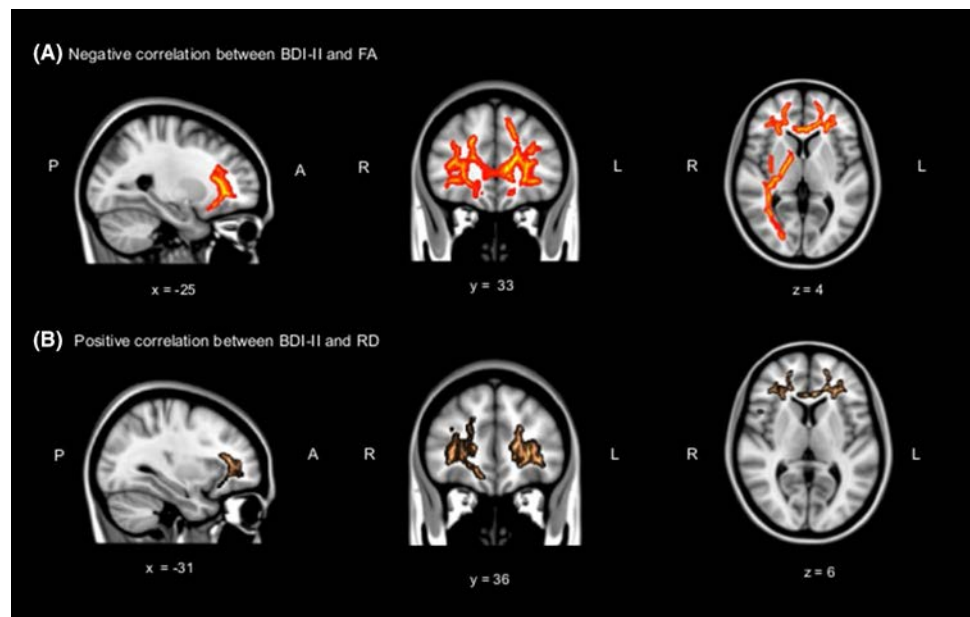
BDI-II Beck Depression Inventory II

STAI State-Trait Anxiety Inventory

^aDifferences between groups in the post-hoc analysis:

1 healthy controls–active CS patients $p = 0.002$; healthy controls–controlled CS patients $p = 0.030$; healthy controls–cured CS patients $p = 0.001$, 2 healthy controls–active CS patients $p = 0.016$; healthy controls–cured CS patients $p = 0.028$, 3 healthy controls–active CS patients $p = 0.003$; healthy controls–controlled CS patients $p = 0.023$; healthy controls–cured CS patients $p = 0.001$

Fig. 1 Correlations between Beck Depression Inventory II (BDI-II) and diffusion tensor imaging (DTI) maps. **a** Negative correlations (highlighted) between Beck scores and fractional anisotropy (FA). **b** Positive correlations (highlighted) between BDI-II scores and radial diffusivity (RD) values, Rows show selected corona; sagittal and axial slices with a MNI152 brain template images (MNI coordinates; $p < 0.05$, TFCE corrected). R right, L left, A anterior, P posterior



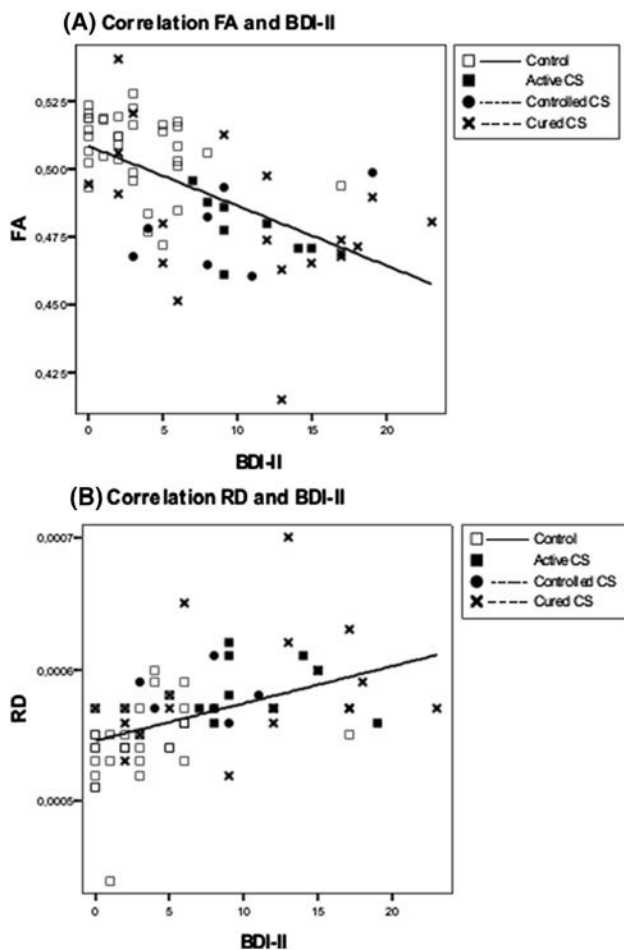


Fig. 2 **a** Fractional anisotropy (FA) values and Beck Depression Inventory II (BDI-II) scores for healthy controls, active Cushing's syndrome (CS), controlled CS and cured CS patients. *Y* axis mean FA values of significant areas. *X* axis BDI-II scores. **b** Radial diffusivity (RD) values and Beck Depression Inventory II (BDI-II) scores for healthy controls, active Cushing's Syndrome (CS), controlled CS and cured CS patients. *Y* axis mean RD values of significant areas. *X* axis BDI-II scores

following a linear distribution ($p < 0.01$ and $r = -0.572$) (Fig. 2a). Positive correlations were found between the BDI-II and RD values in the frontal regions of the forceps minor and frontal areas of bilateral IFOFs (Fig. 1b), also following a linear distribution ($p < 0.01$, $r = 0.468$) (Fig. 2b). No correlations were found between the State or Trait STAI scores and DTI values (FA, MD, AD or RD).

SDMT correlated positively to FA values in the both anterior thalamic radiation (ATR), CSTs, left cingulum of the cingulate gyrus, right cingulum of the hippocampus, forceps major, forceps minor, bilateral IFOF, right ILF, bilateral SLF and bilateral uncinate fasciculus (UF) (Fig. 3a), following a linear distribution ($p < 0.01$, $r = 0.587$) (Fig. 4a). SDMT also correlated positively with

AD values in the right CST (Fig. 3b), also following a linear distribution ($p < 0.01$, $r = 0.486$) (Fig. 4b).

Discussion

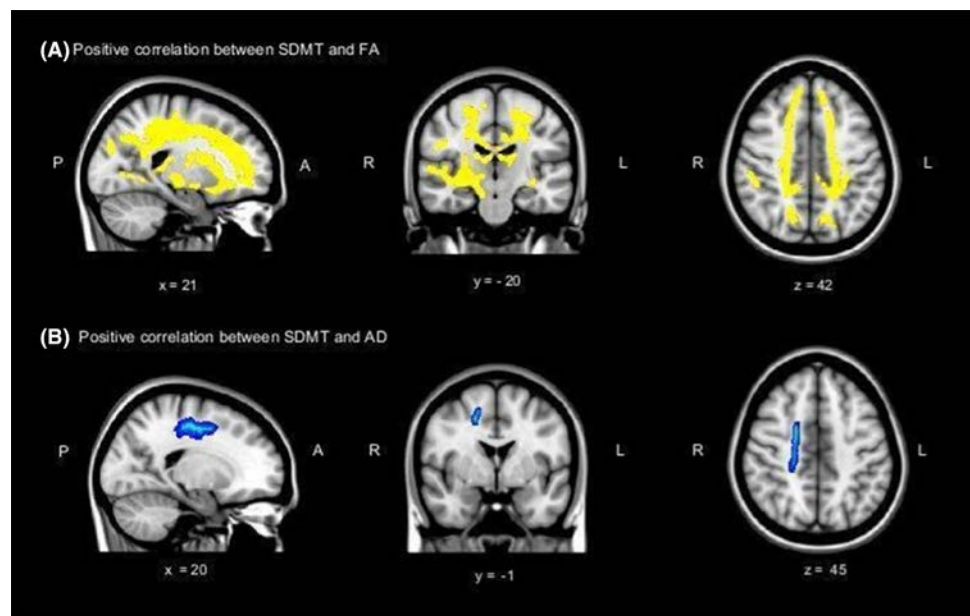
This case-control study shows greater mood disturbances (depression and anxiety symptoms), but no differences in information processing speed, in CS patients compared to healthy controls. Moreover, FA correlated negatively with depressive symptoms and positively with information processing speed, a reflection of the functional significance that microstructural loss of WM integrity may have in CS patients.

BDI-II results showed that all CS groups were more depressed than healthy controls, in agreement with previous evidence showing that CS is associated with greater distress vulnerability [21], and psychiatric symptoms [22], mainly depression [23, 24]. Additionally, our results indicate that psychiatric morbidity persists in cured CS compared to healthy controls, both for depressive and anxiety symptoms. Along this line, hypercortisolism appears to interfere with both depression and anxiety symptoms, with improvement after cortisol normalization [25], although recovery may not be complete [26]. These psychiatric/mood disturbances may contribute to impaired quality of life of CS patients during long term follow-up, as has been suggested [27–32].

In agreement with our hypothesis, we also found that depressive symptoms were related with WM loss of integrity on MRI. Therefore, there was a greater severity of depression when WM was more affected, namely having further decreased FA and increased RD values, a pattern which is linked to loss of myelin and axonal integrity [33]. Previous studies have suggested that changes in cerebral WM microstructure and in myelin gene expression may contribute to mood and cognition in various psychiatric disorders [34]. WM demyelination was observed on DTI throughout the frontal lobes, an area frequently associated to affective disorders and where WM abnormalities (decreased FAs) have been systematically reported in major depression [35], especially when dealing with late-life depression [36]. Interestingly, a recent study demonstrated decreased FA in the uncinate fasciculus in CS patients related to depressive symptoms [11], but no further DTI maps were examined. All these data together suggest that, at least partly, the observed greater mood disturbances in CS seem to be related to WM involvement/loss of integrity in these brain regions.

Additionally, our results showed higher trait anxiety in all CS patients, and higher state anxiety in active and cured CS patients compared to healthy controls, this supporting the comorbid depressive-anxious syndrome theory in CS

Fig. 3 Correlation between Symbol Digit Modalities Test (SDMT) performance and (DTI) maps. **a** Positive correlations (highlighted) between SDMT performance and fractional anisotropy (FA) values, **b** positive correlations (highlighted) between SDMT performances and axial diffusivity (AD) values, Rows show selected coronal, sagittal and axial slices with a MNI152 brain templated image (MNI coordinates; $p < 0.05$, TFCE corrected). *R* right, *L* left, *A* anterior, *P* posterior



[5, 37]. However, although all CS patient groups had higher scores of depressive and anxious symptoms compared with healthy controls, most of the patients remained within normal ranges according to BDI-II and STAI.

To the best of our knowledge, this is the first study regarding WM state and anxious symptomatology in CS. Previous research in healthy subjects has found negative correlations between trait anxiety levels and FA values in the amygdala and prefrontal areas [38]. Other areas of the brain circuit have also been related to anxiety [39], and for example, Modi and colleagues [40] found positive correlations between trait anxiety scores and FA values in the fornix and uncinate fasciculus (UF).

Cognition—particularly information processing speed—, and mood seem to be related to each other, and to integrity of the WM. Processing speed performance has been traditionally related to WM state because of its connectivity function [41–43]. In particular, FA decreases related to information processing speed deficits have been found in late-life depression [35]. Also, cognitive dysfunction and brain structural abnormalities have been previously described in CS [22, 26, 27, 44–47]. However, our results did not show any differences in information processing speed between CS and healthy controls, something that may be related to the small sample size, and/or to these alterations being subtle. It is known that information-processing speed is related to WM integrity [33], being negatively correlated with FA in older adult populations [48]. To the best of our knowledge, no previous studies have analyzed microstructural WM

state related to information processing speed in CS. Our results showed positive correlations between SDMT and widespread, whole-brain FA and AD values in the right CST. This seems to imply that WM state/integrity determine an improved execution of information processing in CS patients and controls.

Our study has some limitations. The sample size of patients included was small, since CS is a rare disease. We only demonstrated differences of anxiety state in active and cured CS patients compared to healthy controls, but not between healthy controls and controlled CS patients. However, this may be due to a type II error, given the small size of these two latter groups. Additionally, more selective vulnerability of precise WM regions/tracts involved in speed processing, that may be less shown on DTI-maps, can not be excluded.

In conclusion, we found that CS patients showed higher scores of anxiety and depressive symptoms than healthy controls. Moreover, there were significant correlations between loss of WM integrity and depression, and a DTI pattern linked to demyelination (low FA and high RD), especially in frontal brain areas. We also found significant positive correlations between WM integrity (high FA and AD) and information processing speed performance scores. These findings highlight the importance of avoiding delays in final diagnosis of CS, with the aim of preventing further WM damage and more profound psychiatric and cognitive dysfunctions.

Acknowledgements We want to thank patients and healthy volunteers who participated in the current study for their kind cooperation.

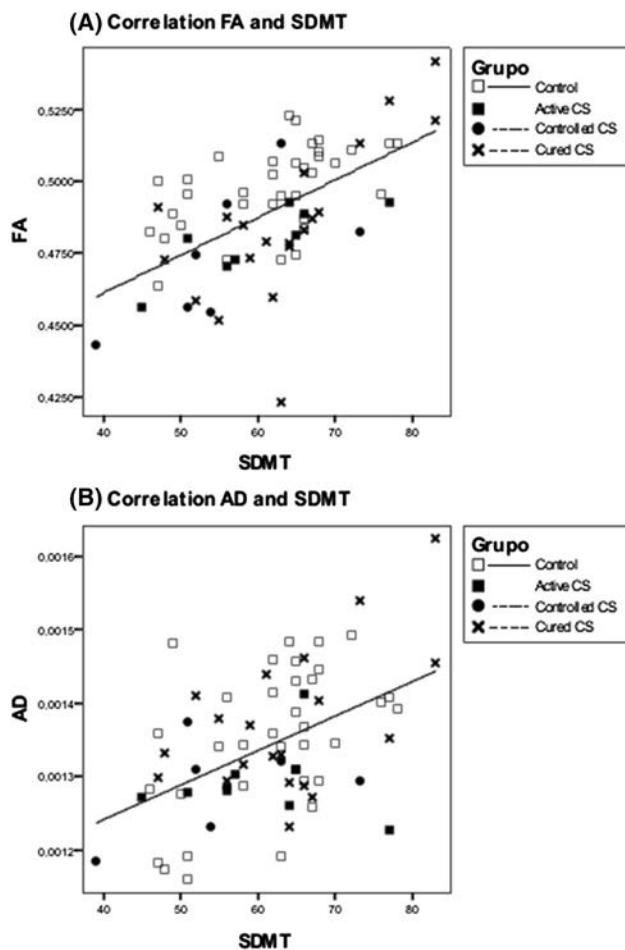


Fig. 4 **a** Fractional anisotropy (FA) values and Symbol Digit Modalities Test (SDMT) scores for healthy controls, active CS, controlled CS and cured CS patients. *Y* axis mean FA values of significant areas, *X* axis SDMT scores. **b** Axial diffusivity (AD) values and Symbol Digit Modalities Test (SDMT) scores dispersion for healthy controls, active Cushing Syndrome (CS), controlled CS and cured CS patients. *Y* axis mean AD values of significant areas, *X* axis SDMT scores

Funding This project was supported by grants from ISCIII, Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, FIS080302 and FIS 070770) and the European Commission (ERCUSYN PHP800200).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Patricia Pires, Alicia Santos, Yolanda Vives-Gilabert, Susan Webb, Aitor Sainz-Ruiz, Eugenia Resmini declares, Iris Crespo, Manuel de Juan-Delago and Beatriz Gómez-Ansón declares that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Research involving animal rights This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Bertagna X, Guignat L, Groussin L, Bertherat J (2009) Cushing's disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23(5):607–623
- Hatipoglu BA (2012) Cushing's syndrome. *J Surg Oncol* 106(5):565–571
- Starr AM (1952) Personality changes in Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 12(5):502–505
- Kelly WF (1996) Psychiatric aspects of Cushing's syndrome. *QJM* 89(7):543–551
- Loosen PT, Chambliss B, DeBold CR, Shelton R, Orth DN (1992) Psychiatric phenomenology in Cushing's disease. *Pharmacopsychiatry* 25(4):192–198
- Bourdeau I, Bard C, Forget H, Boulanger Y, Cohen H, Lacroix A (2005) Cognitive function and cerebral assessment in patients who have Cushing's syndrome. *Endocrinol metab clin N Am* 34(2), 357–369
- Andela CD, Van Haalen F, Ragnarsson O, Papakokkinou E, Johannsson G, Santos A, Webb S, Biermasz NR, van der Wee NJ, Pereira AM (2015) Mechanisms in endocrinology: Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. *Eur J Endocrinol* 173(1):R1–R14
- Budde MD, Xie M, Cross AH, Song SK (2009) Axial diffusivity is the primary correlate of axonal injury in the experimental autoimmune encephalomyelitis spinal cord: a quantitative pixelwise analysis. *J Neurosci* 29(9):2805–2813. doi:10.1523/JNEUROSCI.4605-08.2009
- Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS (2007) Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics* 4(3):316–329. doi:10.1016/j.nurt.2007.05.011
- Pires P, Santos A, Vives-Gilabert Y, Webb SM, Sainz-Ruiz A, Resmini E, Crespo I, de Juan-Delago M, Gómez-Ansón B (2015) White matter alterations in the brains of patients with active, remitted, and cured Cushing syndrome: a DTI study. *AJNR Am J Neuroradiol* 36(6):1043–1048
- van der Werff SJA, Andela CD, Nienke Pannekoek J, Meijer OC, van Buchem MA, Rombouts SARB, van der Mast RC, Biermasz NR, Pereira AM, van der Wee NJA (2014) Widespread reductions of white matter integrity in patients with long-term remission of Cushing's disease. *NeuroImage* 4, 659–667. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.01.017
- Gutiérrez R, Boison D, Heinemann U, Stoffel W (1995) Decomposition of CNS myelin leads to a reduction of the conduction velocity of action potentials in optic nerve. *Neurosci Lett* 195(2):93–96
- Hsu JL, Chen YL, Leu JG, Jaw FS, Lee CH, Tsai YF, Hsu CY, Bai CH, Leemans A (2012) Microstructural white matter abnormalities in type 2 diabetes mellitus: a diffusion tensor imaging study. *Neuroimage* 59(2):1098–1105. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.09.041
- Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J (1961) An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry* 4:561–571
- Smith A (1982) Symbol digit modalities test: manual. Western Psychological Services, Los Angeles

16. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, Johansen-Berg H, Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, Flitney DE, Niazy RK, Saunders J, Vickers J, Zhang Y, De Stefano N, Brady JM, Matthews PM (2004) Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage* 23(Suppl 1):S208–219. doi:[10.1016/j.neuroimage.2004.07.051](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.051)
<https://neuroweb.pic.es>
17. Smith SM (2002) Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp* 17(3):143–155. doi:[10.1002/hbm.10062](https://doi.org/10.1002/hbm.10062)
18. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, Watkins KE, Ciccarelli O, Cader MZ, Matthews PM, Behrens TE (2006) Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* 31:1487–1505
19. Smith SM, Nichols TE (2009) Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. *Neuroimage*, 44(1), 83–98. doi:[10.1016/j.neuroimage.2008.03.061](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.03.061)
20. Sonino N (1997) From the lesson of Harvey Cushing to current knowledge: psychosocial aspects of endocrine disease. *Psychother Psychosom* 66:113–116
21. Sonino N, Fava GA (2001) Psychiatric disorders associated with Cushing's syndrome. *Epidemiology, pathophysiology and treatment. CNS Drugs* 15:361–373
22. Sonino N, Fallo F, Fava GA (2010) Psychosomatic aspects of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 11(2):95–104. doi:[10.1007/s11154-009-9123-7](https://doi.org/10.1007/s11154-009-9123-7)
23. Starkman MN, Scheingart DE, Schork MA (1981) Depressed mood and other psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: relationship to hormone levels. *Psychosom Med* 43(1):3–18
24. Kelly WF, Kelly MJ, Faragher B (1996) A prospective study of psychiatric and psychological aspects of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol* 45(6):715–720
25. Andela CD, Van Haalen F, Ragnarsson O, Papakokkinou E, Johannsson G, Santos A, Webb S, Biermasz NR, van der Wee NJ, Pereira AM (2015) Mechanisms in endocrinology: Cushing's syndrome causes irreversible effects on the human brain: a systematic review of structural and functional magnetic resonance imaging studies. *Eur J Endocrinol* 173(1):R1–R14. doi:[10.1530/EJE-14-1101](https://doi.org/10.1530/EJE-14-1101)
26. Sonino N, Navarrini C, Ruini C, Ottolini F, Paoletta A, Fallo F, Boscaro M, Fava GA (2004) Persistent psychological distress in patients treated for endocrine disease. *Psychother Psychosom*, 73(2):78–83. doi:[10.1159/000075538](https://doi.org/10.1159/000075538)
27. Sobrinho LG (2004) Psychopathology in endocrine disorders: why so persistent after the cure? *Psychother Psychosom* 73(2):65–67. doi:[10.1159/000075536](https://doi.org/10.1159/000075536)
28. Pereira, AM, Tiemensma J, Romijn JA (2010) Neuropsychiatric disorders in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 92(Suppl 1):65–70. doi:[10.1159/000314317](https://doi.org/10.1159/000314317)
29. Heald AH, Ghosh S, Bray S, Gibson C, Anderson SG, Buckler H, Fowler HL (2004) Long-term negative impact on quality of life in patients with successfully treated Cushing's disease. *Clin Endocrinol*:61(4):458–465. doi:[10.1111/j.1365-2265.2004.02118.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02118.x)
30. van der Klaauw AA, Kars M, Biermasz NR, Roelfsema F, Dekkers OM, Corssmit EP, van Aken MO, Havekes B, Pereira AM, Pijl H, Smit JW, Romijn JA (2008) Disease-specific impairments in quality of life during long-term follow-up of patients with different pituitary adenomas. *Clin Endocrinol* 69(5):775–784. doi:[10.1111/j.1365-2265.2008.03288.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03288.x)
31. Santos A, Crespo I, Aulinas A, Resmini E, Valassi E, Webb SM (2015) Quality of life in Cushing's syndrome. *Pituitary* 18(2):195–200. doi:[10.1007/s11102-015-0640-y](https://doi.org/10.1007/s11102-015-0640-y)
32. Song S-K, Yoshino J, Le TQ, Lin S-J, Sun S-W, Cross AH, Armstrong RC (2005) Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* 26(1):132–140. doi:[10.1016/j.neuroimage.2005.01.028](https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.01.028)
33. Fields RD (2008) White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31(7):361–370. doi:[10.1016/j.tins.2008.04.001](https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.04.001)
34. Sexton CE, Mackay CE, Ebmeier KP (2009) A systematic review of diffusion tensor imaging studies in affective disorders. *Biol Psychiatry* 66(9):814–823. doi:[10.1016/j.biopsych.2009.05.024](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.05.024)
35. Sexton CE, Allan CL, Le Masurier M, McDermott LM, Kalu UG, Herrmann LL, Mäurer M, Bradley KM, Mackay CE, Ebmeier KP (2012) Magnetic resonance imaging in late-life depression: multimodal examination of network disruption. *Arch Gen Psychiatry* 69(7):680–689. doi:[10.1001/archgenpsychiatry.2011.1862](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.1862)
36. Mazet P, Simon D, Luton JP, Bricaire H (1981) Psychic symptoms and personality of 50 patients with Cushing's syndrome (author's transl). *La Nouvelle Presse Médicale* 10(31):2565–2570
37. Kim MJ, Whalen PJ (2009). The structural integrity of an amygdala-prefrontal pathway predicts trait anxiety. *J Neurosci* 29(37):11614–11618. doi:[10.1523/JNEUROSCI.2335-09.2009](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2335-09.2009)
38. Ayling E, Aghajani M, Fouche J-P, van der Wee N (2012) Diffusion tensor imaging in anxiety disorders. *Curr Psychiatry Rep* 14(3):197–202. doi:[10.1007/s11920-012-0273-z](https://doi.org/10.1007/s11920-012-0273-z)
39. Modi S, Trivedi R, Singh K, Kumar P, Rathore RKS, Tripathi RP, Khushu S (2013) Individual differences in trait anxiety are associated with white matter tract integrity in fornix and uncinate fasciculus: preliminary evidence from a DTI based tractography study. *Behav Brain Res* 238:188–192. doi:[10.1016/j.bbr.2012.10.007](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.007)
40. van den Heuvel DMJ, ten Dam VH, de Craen AJM, Admiraal-Behloul F, Olofsen H, Bollen, ELEM, Jolles J, Murray HM, Blauw GJ, Westendorp RG, van Buchem MA (2006) Increase in periventricular white matter hyperintensities parallels decline in mental processing speed in a non-demented elderly population. *J Neurol Neurosurg Psych* 77(2):149–153. doi:[10.1136/jnnp.2005.070193](https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.070193)
41. Borghesani PR, Madhyastha TM, Aylward EH, Reiter MA, Swamy BR, Schaie KW, Willis SL (2013) The association between higher order abilities, processing speed, and age are variably mediated by white matter integrity during typical aging. *Neuropsychologia* 51(8):1435–1444. doi:[10.1016/j.neuropsychologia.2013.03.005](https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2013.03.005)
42. Jacobs HIL, Leritz EC, Williams VJ, Van Boxtel MPI, van der Elst W, Jolles J, Verhey FR, MC Glinchey RE, Milberg WP, Salat DH (2013) Association between white matter microstructure, executive functions, and processing speed in older adults: the impact of vascular health. *Hum Brain Mapp* 34(1):77–95. doi:[10.1002/hbm.21412](https://doi.org/10.1002/hbm.21412)
43. Bourdeau I, Bard C, Noël B, Leclerc I, Cordeau M-P, Bélair M, Lesage J, Lafontaine L, Lacroix A (2002) Loss of brain volume in endogenous Cushing's syndrome and its reversibility after correction of hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 87(5):1949–1954. doi:[10.1210/jcem.87.5.8493](https://doi.org/10.1210/jcem.87.5.8493)
44. Resmini E, Santos A, Gómez-Anson B, Vives Y, Pires P, Crespo I, Portella MJ, de Juan-Delago M, Barahona MJ, Webb SM (2012) Verbal and visual memory performance and hippocampal volumes, measured by 3-Tesla magnetic resonance imaging, in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 97(2):663–671. doi:[10.1210/jc.2011-2231](https://doi.org/10.1210/jc.2011-2231)
45. Santos A, Resmini E, Crespo I, Pires P, Vives-Gilabert Y, Granell E, Valassi E, Gómez-Ansón B, Martínez-Momblán MA, Mataró M, Webb SM (2014) Small cerebellar cortex volume

- in patients with active Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 171(4):461–469. doi:[10.1530/EJE-14-0371](https://doi.org/10.1530/EJE-14-0371)
47. Crespo I, Santos A, Gómez-Ansón B, López-Moureló O, Pires P, Vives-Gilabert Y, Webb SM, Resmini E (2016) Brain metabolite abnormalities in ventromedial prefrontal cortex are related to duration of hypercortisolism and anxiety in patients with Cushing's syndrome. *Endocrine*. doi:[10.1007/s12020-016-0963-0](https://doi.org/10.1007/s12020-016-0963-0)
48. Kerchner GA, Racine CA, Hale S, Wilhelm R, Laluz V, Miller BL, Kramer JH (2012) Cognitive processing speed in older adults: relationship with white matter integrity. *PLoS ONE* 7(11):e50425. doi:[10.1371/journal.pone.0050425](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050425)