

## PROTOCOLLO ARMONIZZATO RICERCA

Italian **D I A N**

*Per le forme familiari di demenza  
(malattia di Alzheimer e  
degenerazione lobare frontotemporale)*

**Protocollo di ricerca sviluppato all'interno del progetto “Italian Network for autosomal dominant Alzheimer’s disease and frontotemporal lobar degeneration” RF-2010-2319722 finanziato dal Ministero della Salute Italiano.**

Hanno collaborato alla definizione ed alla stesura del Protocollo:

1. IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli – Brescia (PI: Giovanni B. Frisoni).
2. IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta – Milano (PI: Fabrizio Tagliavini).
3. Università di Firenze (PI: Sandro Sorbi).
4. Centro Regionale Neurogenetica – Lamezia Terme (PI: Amalia C. Bruni).
5. Università di Brescia (PI: Alessandro Padovani).
6. Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico – Milano (PI: Elio Scarpini).
7. Università di Roma “La Sapienza” – Roma (PI: Claudio Babiloni).

## Sinossi

---

Questo protocollo di ricerca, realizzato all'interno del progetto di ricerca "*Italian Network for autosomal dominant Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration*" ed armonizzato a livello italiano, è stato sviluppato in modo specifico per le famiglie in cui sia stata identificata una mutazione autosomica dominante per la malattia di Alzheimer (AD) o la degenerazione lobare frontotemporale (FTLD).

Tale protocollo è rivolto agli specialisti ed ai ricercatori che vogliono studiare in modo strutturato e standardizzato l'eziologia e la possibile evoluzione di malattia nel soggetto affetto, o a rischio, per queste forme familiari di demenza indagandone il substrato neurobiologico e le caratteristiche neurofisiologiche, di neuroimmagini, cliniche e neuropsicologiche.

Questo documento include due protocolli armonizzati, uno specifico per AD (Protocollo I) e l'altro per FTLD (Protocollo II). All'interno di ognuno di essi sono riportati le modalità per la raccolta e la conservazione del materiale biologico (Sezione I), le procedure ed i materiali da utilizzare per la valutazione clinica e neuropsicologica (Sezione II) e le procedure di acquisizione per gli esami neurofisiologici e di neuroimmagini (Sezione III-IV).

Il Protocollo I sarà seguito per la valutazione di membri di famiglie in cui sia stata identificata una mutazione autosomica dominante per AD in uno dei seguenti geni: PSEN1, PSEN2 o APP.

Il Protocollo II sarà seguito per la valutazione di membri di famiglie in cui sia stata identificata una mutazione autosomica dominante per FTLD nei geni MAPT o PGRN oppure la ripetuta espansione dell'esanucleotide nel gene C9ORF72.

I due protocolli risultano armonizzati anche a livello internazionale con i due maggiori progetti attualmente in corso sulle forme genetiche autosomiche dominanti di demenza: il protocollo per AD è stato delineato in base alle procedure di studio utilizzate nel progetto americano DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer Network, <http://www.dian-info.org/>), mentre il protocollo per FTLD ha adottato le procedure di GENFI-2 (GENetic Frontotemporal Dementia Initiative, <https://www.ucl.ac.uk/drc/research/current-studies/genfi>).

È importante sottolineare che questi protocolli sono stati sviluppati per svolgere studi su forme familiari di demenza, e specificamente su famiglie in cui è stata identificata una mutazione genetica autosomica dominante. La partecipazione di un soggetto a studi di questo tipo prevede la conoscenza del proprio stato di rischio genetico. Trattandosi di una questione molto delicata e che comporta una serie di implicazioni personali, interpersonali, psicologiche ed etiche è importante che il potenziale partecipante sia stato precedentemente supportato ed aiutato nel gestire tali implicazioni attraverso un percorso di consulenza genetica. All'interno del progetto ItalianDIAfN sono state inoltre sviluppate delle linee guida a livello italiano per la strutturazione di un servizio di consulenza genetica, descritte nel documento "*Protocollo armonizzato di Consulenza Genetica*".

## **Sommario**

---

### **PROTOCOLLO I – Forme familiari di Malattia di Alzheimer** **PAG.05**

#### **Sezione 1. Materiale Biologico**

Procedura armonizzata per la raccolta dei campioni biologici	PAG.07
Flowchart genetica armonizzata	PAG.08
Procedura per il prelievo e la processazione del sangue	PAG.10
Procedura per la coltura dei fibroblasti	PAG.13
Procedura per il prelievo e la processazione del CSF	PAG.13
Procedura per il prelievo dell'urina	PAG.13
Sinossi riassuntiva della raccolta del materiale biologico	PAG.14

#### **Sezione 2. Valutazione Clinica e Neuropsicologica**

1. VALUTAZIONE MEDICA E NEUROLOGICA	PAG. 17
2. RACCOLTA INFORMAZIONI ANAMNESTICHE	PAG. 17
3. VALUTAZIONE CLINICA	PAG. 17
4. VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA	PAG. 17

#### **Sezione 3. Esami di Neurofisiologia**

- EEG	PAG. 20
-------	---------

#### **Sezione 4. Esami di Neuroimmagine**

- RMN	PAG. 24
- FDG-PET	PAG. 25
- Amyloid-PET	PAG. 26

### **PROTOCOLLO II – Forme familiari di Degenerazione lobare frontotemporale** **PAG.27**

#### **Sezione 1. Materiale Biologico**

Procedura armonizzata per la raccolta dei campioni biologici	PAG.29
Flowchart genetica armonizzata	PAG.30
Procedura per il prelievo e la processazione del sangue	PAG.31
Procedura per la coltura dei fibroblasti	PAG.34
Procedura per il prelievo e la processazione del CSF	PAG.34
Procedura per il prelievo dell'urina	PAG.34
Sinossi riassuntiva della raccolta del materiale biologico	PAG.35

## **Sezione 2. Valutazione Clinica e Neuropsicologica**

1. VALUTAZIONE MEDICA E NEUROLOGICA	PAG. 37
2. RACCOLTA INFORMAZIONI ANAMNESTICHE	PAG. 37
3. VALUTAZIONE CLINICA	PAG. 37
4. VALUTAZIONE NEUROPSICOLOGICA	PAG. 37

## **Sezione 3. Esami di Neurofisiologia**

- EEG	PAG. 39
-------	---------

## **Sezione 4. Esami di Neuroimmagine**

- RMN	PAG. 43
- FDG-PET	PAG. 44

## **Protocollo I**

---

### **PROTOCOLLO ARMONIZZATO RICERCA**

**Italian D I A N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
MALATTIA di ALZHEIMER***

## **Protocollo I**

---

### **Sezione 1.**

# **PROTOCOLLO ARMONIZZATO RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
MALATTIA di ALZHEIMER***

***Materiale Biologico***

## **CAMPIONI BIOLOGICI**

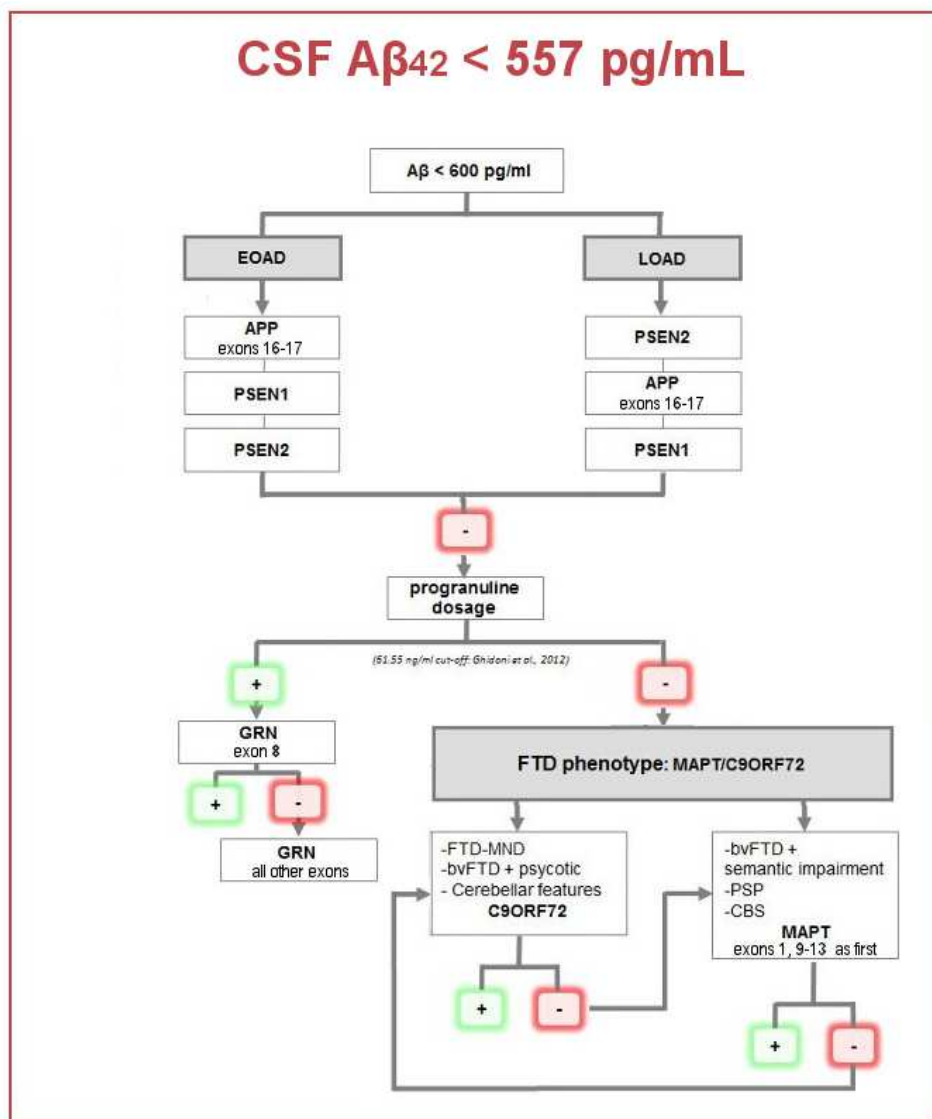
Il protocollo ItalianDIAfN prevede la raccolta di campioni biologici di sangue (per RNA, DNA, siero, plasma e linfociti), di urina, di liquido cerebrospinale (attraverso la puntura lombare), e la cultura dei fibroblasti prelevati attraverso una biopsia cutanea.

Di seguito sono riportati i quantitativi stabiliti e suddivisi in vista di uno stoccaggio locale (presso il centro in cui vengono prelevati i campioni) e centrale (Biobanca centralizzata del progetto ItalianDIAfN, presso IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano). Inoltre sono riportati i quantitativi previsti nel caso di stoccaggio presso la Biobanca Internazionale US DIAN (presso University of Washington).

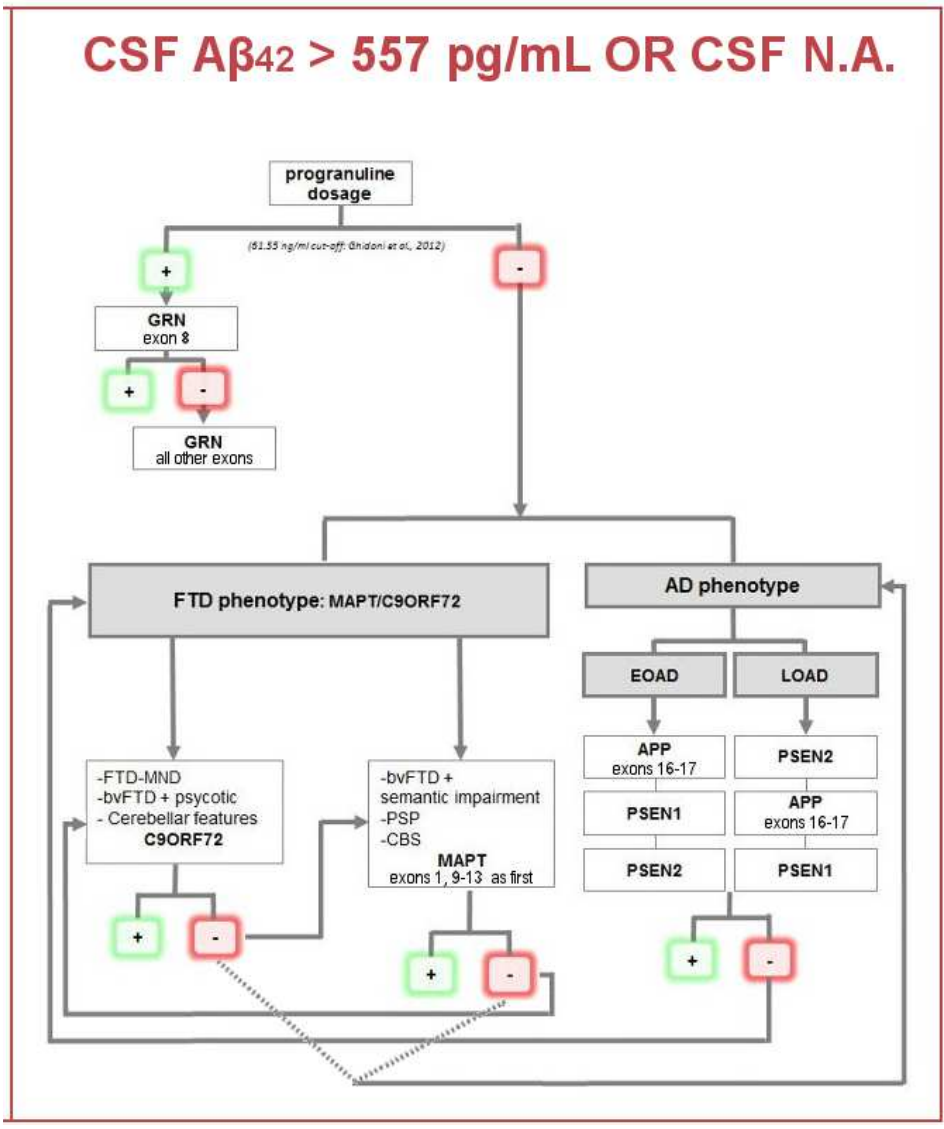
- **Sangue**
  - \* 57 ml totali per la **BIOBANCA CENTRALIZZATA** di cui:
    - \* 6 ml x 3 provette con EDTA per estrazione DNA
    - \* 2,5 ml in provetta PAXgene per estrazione RNA
    - \* 6 ml x 2 provette con EDTA per preparazione di plasma, buffy coat e globuli rossi
    - \* 6 ml x 2 provette con eparina per linfociti da immortalizzare
    - \* 6 ml x 2 provette per preparazione siero
  - \* 40 ml totali per la **BIOBANCA US DIAN** di cui:
    - \* 10 ml x 2 provette con EDTA per estrazione plasma, buffy coat e globuli rossi
    - \* 10 ml x 2 provette per preparazione siero
  - \* 18 ml totali per la **BIOBANCA LOCALE** di cui:
    - \* 6 ml x 1 provetta con EDTA per estrazione DNA
    - \* 6 ml x 1 provette con Sodio Citrato per preparazione di plasma
    - \* 6 ml x 1 provetta per preparazione siero
- **CSF**
  - \* 23 ml totali di cui:
    - \* 9 ml per la **BIOBANCA LOCALE**
    - \* 7 ml per **BIOBANCA CENTRALIZZATA**
    - \* 7 ml per **BIOBANCA US DIAN**
- **Urina**
  - \* 10 ml x 2 provette per la **BIOBANCA CENTRALIZZATA**
- **Fibroblasti in coltura:** Prelievo cute con punch da 3 mm; 4 criovials corrispondenti a 2 flask da 75 cm<sup>2</sup> al passaggio p2 o p3 per la **BIOBANCA CENTRALIZZATA**

Le analisi biochimiche da eseguire sul campione di CSF sono i livelli di  $A\beta_{1-42}$ , tau totale e phospho-tau<sub>181</sub>.

Le analisi genetiche da eseguire sui campioni di sangue sono il genotipo APOE e lo studio dei geni PSEN1, PSEN2 ed APP, seguendo le seguenti flowchart:







## **PROCEDURE PER IL PRELIEVO E PROCESSAZIONE DEL SANGUE**

### ➤ **2 Provette con EDTA per Plasma, Buffy Coat e Globuli Rossi (6 ml x 2; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Centrifugare a 2000 x g per 15 minuti, T ambiente
- Prelevare il plasma, trasferirlo in provette di polipropilene (aliquote da 0.5 ml x 8 provette), congelare e conservare a -80°C.
- Prelevare buffy coat (quanto più possibile fino ad un max di 0,5 ml x 2 provette) e globuli rossi (aliquote da 0.5ml x 6 provette), trasferirli nelle provette di polipropilene Sarstedt, congelare e conservare a -80°C

### ➤ **2 Provette con EDTA per Plasma, Buffy Coat e Globuli Rossi (10 ml x 2; per BIOBANCA US DIAN)**

- Centrifugare a 2000 x g per 15 minuti, T ambiente
- Prelevare 10 ml di plasma e trasferirlo in 1/2 provette Vacutainer “tappo lilla”, congelare e conservare a -80°C.
- Prelevare buffy coat e globuli rossi, trasferirli in due provette separate di polipropilene (Sarstedt), congelare e conservare a -80°C

### ➤ **2 Provette per siero (6 ml x 2; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Sierare per 30 minuti a T ambiente
- Centrifugare a 2000 x g per 15minuti, T ambiente
- Prelevare il siero, trasferirlo nelle provette di polipropilene Sarstedt (aliquote da 0.5 ml, per 6 provette), congelare e conservare a -80°C

### ➤ **2 Provette per siero (10 ml x 2; per BIOBANCA US DIAN)**

- Sierare per 30 minuti a T ambiente
- Centrifugare a 2000 x g per 15minuti, T ambiente
- Prelevare 10 ml siero, trasferirlo in 1/2 provette Vacutainer “tappo rosso”, congelare e conservare a -80°C

➤ **3 Provette con EDTA per estrazione di DNA (6 ml x 3; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

**Estrazione di linfociti da sangue intero (in EDTA)**

- Mettere in un tubo Arnika (tubo da 50 ml con filtro) 15 ml di Ficoll-Istopaque e centrifugare alla velocità massima 5' per far scendere il Ficoll sotto il filtro.
- Aggiungere il sangue intero non diluito e centrifugare a 1400xg per 15 minuti. Si formerà un anello linfocitario (buffy coat) al di sopra del filtro, immerso nel plasma.
- Versare il surnatante contenente l'anello linfocitario in un tubo da 50 ml e centrifugare a 1800xg per pellettare i linfociti.
- Buttare il surnatante, risospendere il pellet linfocitario con 10 ml di PBS 1X e mettere il tutto in un tubo da 15ml. Centrifugare di nuovo a 1800xg per 15 min
- Buttare il surnatante, lasciare asciugare e conservare il pellet di cellule a -20°C per la successiva estrazione del DNA

**Estrazione DNA da linfociti**

- Aggiungere 3 ml di lysis buffer, 500 µl di PK solution e 200 µl di SDS 10%
- Mettere o.n. a 37°C
- Il giorno dopo aggiungere 1 ml di NaCl 6M
- Vortexare 30 sec.
- Centrifugare 15' a 1100xg
- Prelevare il surnatante limpido e aggiungere 3 volumi di etanolo 100% freddo
- Si dovrebbe vedere il filamento di DNA --> prelevarlo (con la minore quantità possibile di liquido) e metterlo in una provetta da 1,5 ml. Centrifugare e buttare il surnatante.
- Lavare il pellet di DNA con 300 µl di etanolo 70% (aggiungere l'etanolo e rimuoverlo dopo centrifugazione).

- Lasciare asciugare
- Risospendere in 150 µl di TE 1X: 50 µl per l'analisi genetica e 100 µl per banca. Trasferire il campione destinato alla BIOBANCA CENTRALIZZATA in 2 provette di polipropilene della Sarstedt (50 µl per provetta) e segnare sulle provette la concentrazione di DNA

LYSIS BUFFER: TrisHCl 10 mM pH 8, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM

PK SOLUTION: 2 mg di proteinasi K in 1 ml di soluzione di SDS 1% e EDTA 2 mM.

➤ **1 Provetta PAXgene per estrazione RNA (per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Tenere i campioni a T ambiente per 2 ore prima di congelarli a -20°C. Dopo 24 ore a -20°C, trasferirli a -80°C

➤ **2 Provette con eparina per estrazione dei linfociti da immortalizzare (6ml x 2; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Lavorare in condizioni di sterilità
- In un tubo da 50 ml mettere 20ml di Ficoll.
- Versare 12 ml di sangue (in eparina) in un tubo da 50ml e aggiungere 8 ml di PBS 1X (risospendere bene)
- Stratificare il sangue sul Ficoll molto lentamente (il sangue deve rimanere sopra il Ficoll)
- Centrifugare 35 min a 800 x g con accelerazione e decelerazione basse
- Aspirare l'anello linfocitario e il plasma in modo circolare e mettere in un nuovo tubo da 50ml
- Centrifugare 1100 x g 15 min
- Buttare il surnatante e al pellet linfocitario aggiungere 5ml di PBS 1X, agitare con la mano e centrifugare a 1100 x g 15 min
- Buttare il surnatante
- Risospendere bene (se i linfociti non vengono risospesi bene si formano dei grumi che non si immortalizzano) in 2 ml di medium di congelamento (1,8 ml FBS + 200µl DMSO), aliquotare in 2 criovials e mettere a -80°C e poi in azoto

## **PROCEDURE PER COLTURA DI FIBROBLASTI** **(per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Ogni laboratorio può adottare i propri protocolli per la coltura dei fibroblasti
- Inviare alla BIOBANCA CENTRALIZZATA 4 criovials corrispondenti a 2 flask da 75 cm<sup>2</sup> al passaggio p2 o p3

## **PROCEDURE PER IL PRELIEVO E PROCESSAZIONE DEL CSF** **(23 ml totali)**

- Puntura lombare in posizione seduta alle 8.00 del mattino
- Prelevare 23 ml di CSF, di cui
  - \* primi 2 ml per analisi di routine (conta cellule, glucosio e proteine tot, IEF)
  - \* 7 ml per la BIOBANCA CENTRALIZZATA (divisi in 14 aliquote da 0.5 ml)
  - \* 7 ml da spedire al BIOBANCA US DIAN (un'unica aliquota)
  - \* 7 ml da conservare presso la BIOBANCA LOCALE
- Scartare campioni ematici, o, in caso di campione ematico, centrifugare a 2000g per 5 minuti entro 1 ora dal prelievo
- Aliquotare i campioni destinati alla BIOBANCA CENTRALIZZATA nelle provette di polipropilene della Sarstedt e congelare a -80°C fino al trasferimento
- Conservare in un'unica provetta di polipropilene il campione (7 ml) destinato alla BIOBANCA US DIAN e congelare a -80°C fino al trasferimento

## **PROCEDURE PER IL PRELIEVO DELL'URINA** **(20 ml; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Prelevare l'urina al mattino, verso le 8 del mattino
- Centrifugare a 2000 x g per 15 minuti
- Aliquotare in due tubi di polipropilene da 10ml, congelare e conservare a -80°C

**SINOSI: MATERIALE**

<b>TIPO DI CAMPIONE</b>	<b>QUANTITA'</b>	<b>UTILIZZO</b>	<b>QUOTA SANGUE PER BIOBANCA LOCALE</b>
SANGUE (6ml)	1 provetta con EDTA	Estrazione DNA	<i>Centro-Specifico</i> (FBF-Brescia: 500 µl di DNA genomico)
SANGUE (6 ml)	1 provette con Sodio Citrato	Estrazione Plasma	<i>Centro-Specifico</i> (FBF-Brescia: 2-4 ml di plasma)
SANGUE (6 ml)	1 provetta	Estrazione Siero	<i>Centro-Specifico</i> (FBF-Brescia: 2-4 ml di siero)

**TOTALE: 18 ml di SANGUE per BIOBANCA LOCALE**

<b>TIPO DI CAMPIONE</b>	<b>QUANTITA'</b>	<b>UTILIZZO</b>	<b>N° PROVETTE PER BIOBANCA CENTRALIZZATA</b>
SANGUE (18ml)	3 provette con EDTA (6ml x 3=18ml)	Estrazione DNA	50 µl x 2 provette Sarstedt
SANGUE (12ml)	2 provette con EDTA (6ml x 2=12ml)	Estrazione Plasma	0.5 ml x 8 provette Sarstedt
		Estrazione Buffy coat	0.5 ml x 2 provette Sarstedt
		Estrazione Globuli rossi	0.5 ml x 6 provette Sarstedt
SANGUE (12ml)	2 provette con eparina (6ml x 2=12ml)	Linfociti da immortalizzare	1 ml x 2 provette Sarstedt
SANGUE (12ml)	2 provette per siero (6ml x 2=12ml)	Estrazione siero	0.5 ml x 6 provette Sarstedt
SANGUE (2,5ml)	1 provetta Paxgene (2,5ml)	Estrazione RNA	1 provetta Paxgene

**TOTALE: 57 ml di SANGUE per BIOBANCA CENTRALIZZATA**

TIPO DI CAMPIONE	QUANTITA'	UTILIZZO	N° PROVETTE PER BIOBANCA CENTRALIZZATA
SANGUE (20ml)	2 provette con EDTA (10ml x 2=20ml)	Estrazione Plasma	10 ml x 1 provetta Vacutainer tappo lavanda
		Estrazione Buffy coat	1 provetta Sarstedt
		Estrazione Globuli rossi	1 provetta Sarstedt
SANGUE (20ml)	2 provette per siero (10ml x 2=20ml)	Estrazione siero	10 ml in 1 provetta Vacutainer tappo rosso

**TOTALE: 40 ml di SANGUE per BIOBANCA US DIAN**

TIPO DI CAMPIONE	QUANTITA'	UTILIZZO	N° PROVETTE PER BIOBANCA CENTRALIZZATA
CSF (23 ml)	2 ml	Per analisi di routine	
	7 ml	Per il centro di prelievo	
	7 ml	Per BIOBANCA CENTRALIZZATA	0.5 ml x 14 provette Sarstedt
	7 ml	Per BIOBANCA US DIAN	7 ml in 1 provetta di polipropilene

**TOTALE: 23 ml di CSF**

URINA (20ml)	20 ml	Per BIOBANCA CENTRALIZZATA	10 ml x 2 provette Falcon
--------------	-------	----------------------------	---------------------------

**TOTALE: 20 ml di URINA**

FIBROBLASTI	2 flask da 75 cm <sup>2</sup> al passaggio p2 o p3	Per BIOBANCA CENTRALIZZATA	4 provette Sarstedt
-------------	--	----------------------------	---------------------

**Usare solo provette di polipropilene e provette Sarstedt (micro tube 2.0ml with screw cap, cod: 72.694.007) per materiale destinato alla BIOBANCA CENTRALIZZATA**

## **Protocollo I**

---

### **Sezione 2.**

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
MALATTIA di ALZHEIMER***

***Valutazione Clinica e Neuropsicologica***



## **VALUTAZIONE CLINICA E NEUROPSICOLOGICA**

### **Valutazione Medica e Neurologica**

- Valutazione dell'Età di insorgenza
- Segni Vitali (pressione arteriosa, pulsazioni, respirazione, temperatura corporea)
- Esami Fisici
- Esame Obiettivo Neurologico

### **Raccolta informazioni anamnestiche per paziente e rispettivi familiari / fonte collaterale**

- Informazioni demografiche del partecipante
- Informazioni demografiche dell'informatore
- Storia familiare del partecipante
- Storia Medica / Stato di Salute del partecipante

### **Valutazione Clinica**

- Hachinski Ischemic Score
- Scala di Valutazione della Malattia di Parkinson Unificata (UPDRS)
- Clinical Dementia Rating Scale
- Supplemental Clinical Dementia Rating Scale
- Neuropsychiatric Inventory Questionnaire (NIQ-Q)
- Geriatric Depression Scale (GDS)
- Functional Assessment Questionnaire (FAQ)
- Valutazione risultanze degli esami fisici/neurologici
- Giudizio clinico sui sintomi
- Diagnosi clinica (stato cognitivo e demenza)
- Hollingshead Index of Social Position (SES)
- Questionario sull'attività fisica
- International Personality item Pool (IPIP)

### **Valutazione Psicometrica comune per soggetto paziente e per i propri familiari**

- Mini Mental State Examination (MMSE)
- Memoria logica (rievocazione immediata e differita)
- Span di cifre (diretto ed inverso)
- Fluenza verbale (per lettera e per categoria)
- Trail Making Test (TMT-A e TMT-B)

- Boston Naming Test
- Associazione numero-simbolo (WAIS-R)
- Lista di parole (rievocazione immediata e differita)

## **Protocollo I**

---

### **Sezione 3.**

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
MALATTIA di ALZHEIMER***

***Esami di Neurofisiologia***

## EEG

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di un elettroencefalogramma secondo due condizioni: occhi chiusi e occhi aperti.

**Orario di registrazione:** tarda mattinata.

Verrà effettuata una valutazione preliminare delle condizioni del soggetto, prima dell'esecuzione dell'EEG. Essa riguarderà la capacità uditive del soggetto (1000 Hz-tone a 40 dB), e l'uso di agenti psicoattivi utilizzati in genere e nelle 24 ore prima dell'esecuzione dell'esame (cibo, alcoolici, nicotina, caffeina, teina e altri stimolanti). Farmaci come benzodiazepine, antidepressivi e antiipertensivi devono esser sospesi almeno 24 prima dell'esecuzione dell'esame. Verrà poi eseguita una breve intervista attraverso la somministrazione della **Substance Consumption Scale** e della **Epworth Sleepiness Scale**, volta a indagare la qualità del sonno in generale e nella notte precedente all'esecuzione dell'esame.

Di seguito sono riportate le procedure per la registrazione EEG:

**POSITION OF SUBJECTS FOR EEG RECORDING.** Subjects will be seated on a semi-reclined armchair.

**EEG MONTAGE.** To reduce the time of the EEG montage, we use a minimum of 19 standard electrodes placed according to basic 10-20 system (Jasper, 1958; (i.e. Fp1, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, T3, C3, Cz, C4, T4, T5, P3, Pz, P4, T6, O1, O2). A higher number of EEG electrodes extending the basic 10-20 system is appreciated (i.e. TP9 and TP10 electrodes), especially for P300 recordings.

For all EEG recordings, the use of linked earlobe reference electrode are highly appreciated, since the computation of direct transfer function (DTF) for the evaluation of directional functional coupling of EEG rhythms requires extra-cephalic electrode reference. Of note, recorded EEG data will be off-line re-referenced to common average (i.e. a reference free montage) for the EEG source analysis and spectral coherence. Ground electrode should be preferably placed between Fz and Cz electrodes. Resistance of the EEG electrodes should be less than 5 KOhm. Noteworthy, all impedances across electrodes should be quite similar for a valid subsequent EEG data analysis.

**EOG MONTAGE.** Bipolar vertical and horizontal EOGs will be used (see Figure 1); resistance should be lower than 20 KOhm.

**EKG MONTAGE.** A standard pericardiac EKG channel using V6 derivation referenced to right ankle (see Figure 3 for the positioning of V6) should be used for the computation of heart rate variability according to the international guidelines (i.e. R peak is especially well shaped), rough evaluation of cardiac activity, and for the mathematical removal of possible EKG artifacts on EEG traces not detected at the moment of the EEG recording. The position at the trunk of the V6 derivation allows a EKG recording free from artifacts during the hand motor task planned in the auditory oddball paradigm. The EEG recording will start when the quality of EEG recordings is acceptable as judged by an expert of EEG recordings.

**RECORDING SAMPLING for EEG-EOG-EKG.** About 512 Hz frequency sampling will be used (anti-aliasing 0.16Hz-128 Hz pass-band) to ensure EKG recording to be used for the computation of heart rate variability according to the international guidelines. A higher sampling frequency to 1000 Hz (anti-aliasing 0.16Hz-256 Hz pass-band) is appreciated especially for non linear EEG analysis). No notch filter will be on the recorded EEG data. Due to intrinsic technical limitations, EEG equipments for the night sleep recordings may not support frequency sampling of

512 Hz in WP1-sleep deprivation challenge. In that case, about 400 Hz frequency sampling is used for EEG recordings.

**ASSESSMENT OF THE SUBJECT'S CONDITION DURING EEG RECORDING.** A main problem in the protocol is to avoid sleeping onset during eyes-closed condition. In order to keep constant the level of vigilance, an operator will control on-line the subject and the EEG traces, verbally alerting the subject any time there were signs of behavioral (loss of muscular tone) and/or EEG (slowing of EEG with K complexes and sleep spindles) drowsiness. In the case of these signs, the experimenters will talk to subject up to the normalization of EEG (they mark the episode on the corresponding EEG traces).

**RESTING STATE EEG conditions** (MANDATORY, max duration of about 10 minutes)

EEG experiment starts with the resting state EEG conditions:

1) Resting state eyes closed EEG recording for at least 3 minutes (maximum 5 minutes; the duration is established on the basis of the tolerance of experimental subject; ideally, 5 minutes of EEG recordings should be recorded)

(At the end of the resting state eyes closed condition, subjects are asked to open the eyes; pause of 30 seconds at eyes open)

2) Resting state eyes open EEG recording for at least 3 minutes (maximum 5 minutes; see above comment for eyes closed condition)

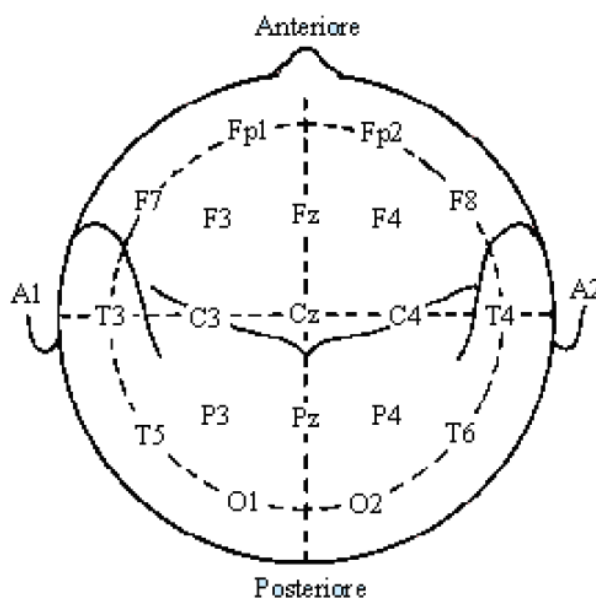
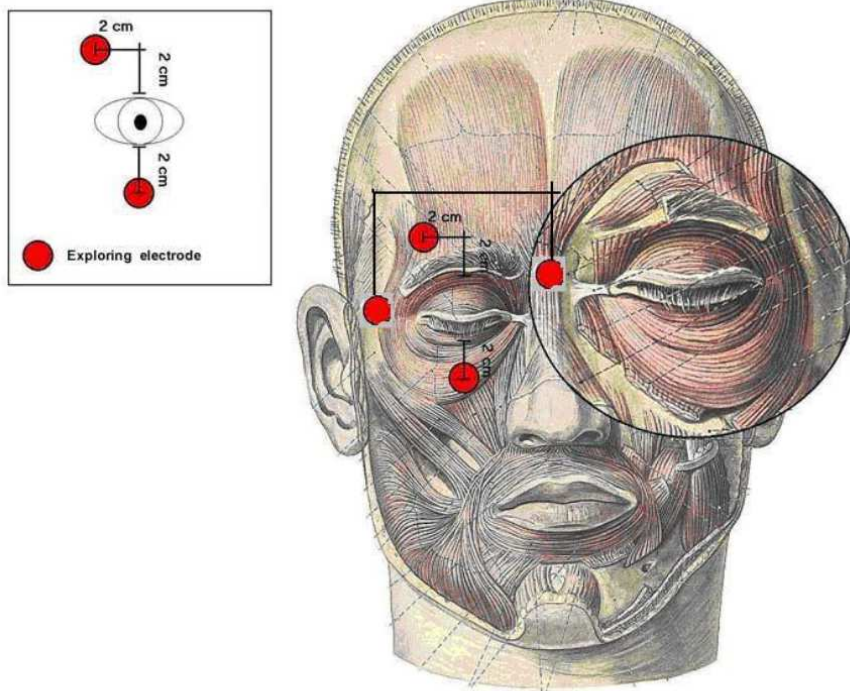
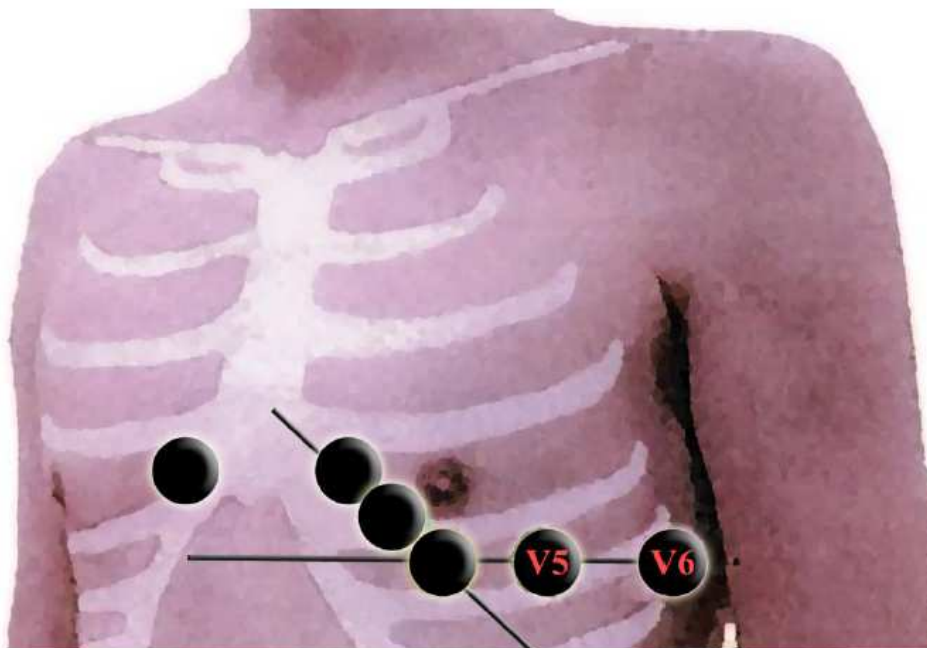


Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

## **Protocollo I**

---

### **Sezione 4.**

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
MALATTIA di ALZHEIMER***

***Esami di Neuroimmagine***

## RISONANZA MAGNETICA

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di una risonanza magnetica a 3 Tesla con le sequenze riportate di seguito:

- T1 volumetrica- T2 volumetrica
- Diffusion Tensor Imaging (DTI)
- risonanza funzionale a riposo (fMRI)
- arterial spin label (ASL)

Le procedure di acquisizione sono armonizzate al protocollo GenFI-2



## **PET con FLUORODESOSSIGLUCOSIO (FDG-PET)**

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di una PET con fluorodesossiglucosio per lo studio della funzione cerebrale nelle diverse aree coinvolte nella genesi dei disturbi cognitivi.

Le procedure di acquisizione sono armonizzate al protocollo US DIAN e per le specifiche si faccia riferimento al documento al seguente link:

<http://www.dian-info.org/resourcedb/PDFs/PET%20Manual.pdf>

## **PET con tracciante fluorinato per Amiloide (Amyloid PET)**

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di un esame PET con tracciante fluorinato per la valutazione dell'amiloidosi cerebrale *in vivo*.

Le procedure previste per l'esecuzione di tale esame sono le seguenti:

- Females of childbearing potential will have a urine pregnancy dipstick test prior to injection (a serum pregnancy test may be obtained, if required by the local site);
- The Nuclear Medicine Physicians or designee will see the subjects prior to dosing to assess their ability to safely tolerate the imaging procedure;
- A mild anxiolytic may be given prior to performing the imaging session for the purpose of
- reducing anxiety. This should be assessed by the Nuclear Medicine Physicians prior to administration;
- The subject will first have a catheter placed for intravenous (i.v.) administration of the 18F-labelled tracer. Patients will receive a single i.v. bolus of approximately 185-370 MBq (5-10 mCi) of 18F-labelled tracer followed by brain PET imaging for 10-30 minutes, beginning approximately 50-110 minutes post-injection. It is recommended that the images be reconstructed and reviewed by a trained technologist or nuclear medicine physician immediately after completion. If the image is not interpretable due to technical artifact (scanner failure, patient motion) the subject may be asked to reenter the scanner and have a second 10-30 minute scan performed. Any AEs will be recorded during the imaging visit. A PIM will be implemented at each imaging center and followed for image acquisition and on-site quality control;
- Any adverse events (AEs) will be recorded during the imaging visit. A PET Imaging Manual (PIM) will be implemented at each imaging center and followed for image acquisition and on-site quality control;
- Subjects will be observed continuously for signs of AEs or SAEs;
- The injection site will be observed for excessive inflammation or damage to the surrounding tissue where the dose was injected; and
- The Nuclear Medicine Physicians or designee will see the subject prior to discharge.

Di seguito, le procedure previste per l'elaborazione delle immagini PET acquisite.

Images will be evaluated qualitatively and quantitatively:

- Images will be visually examined by trained Nuclear Medicine Physicians who are blinded to the subject diagnosis and will be reported as either A $\beta$  positive or A $\beta$  negative.
- Standard uptake value ratios (SUVR) for target areas such as the medial frontal cortex, temporal cortex, parietal cortex, posterior cingulate cortex, anterior cingulate cortex and the precuneus will be calculated with respect to the entire cerebellum.

## **Protocollo II**

---

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE***

## **Protocollo II**

---

### **Sezione 1.**

# **PROTOCOLLO ARMONIZZATO RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE***

***Materiale Biologico***

## **CAMPIONI BIOLOGICI**

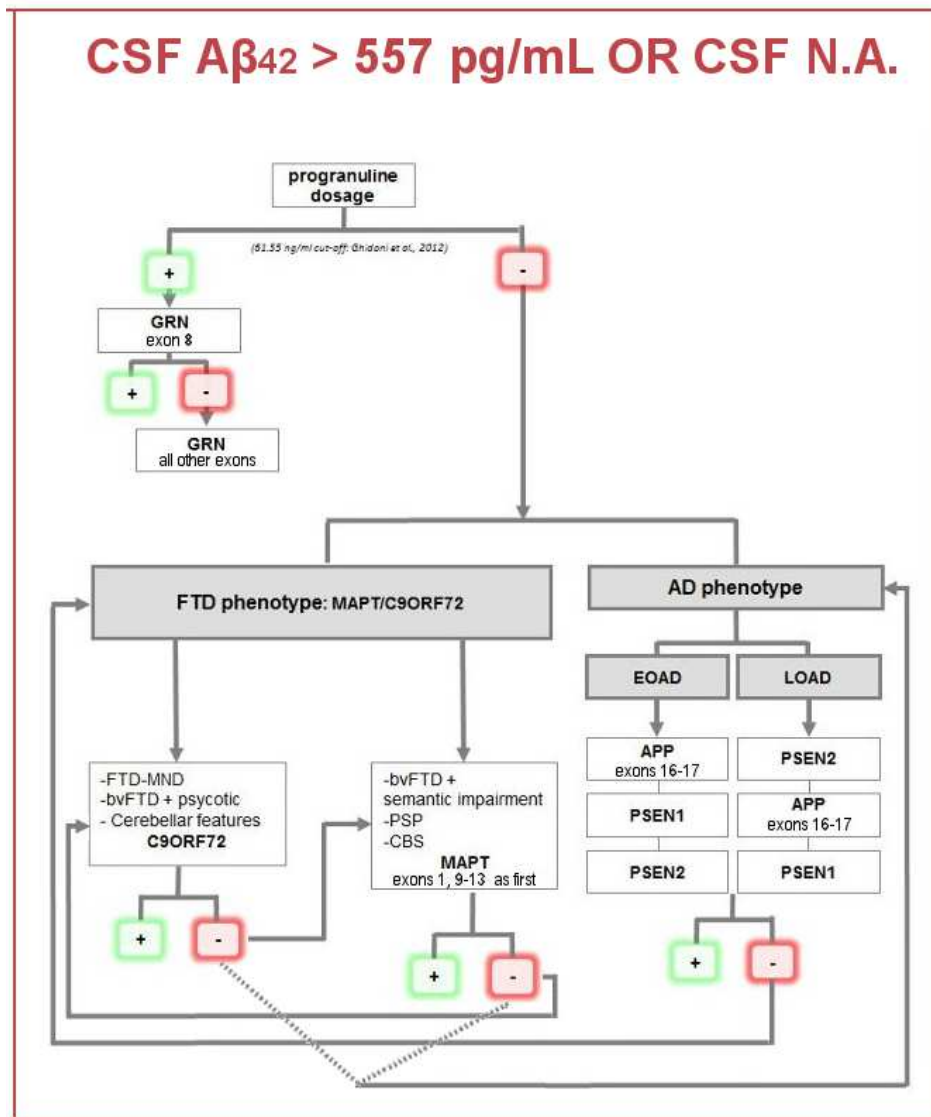
Il protocollo ItalianDIAfN prevede la raccolta di campioni biologici di sangue (per RNA, DNA, siero, plasma e linfociti), di urina, di liquido cerebrospinale (attraverso la puntura lombare), e la cultura dei fibroblasti prelevati attraverso una biopsia cutanea.

Di seguito sono riportati i quantitativi stabiliti e suddivisi in vista di uno stoccaggio locale (presso il centro in cui vengono prelevati i campioni) e centrale (Biobanca centralizzata del progetto ItalianDIAfN, presso IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano).

- **Sangue**
  - \* 57 ml totali per la **BIOBANCA CENTRALIZZATA** di cui:
    - \* 6 ml x 3 provette con EDTA per estrazione DNA
    - \* 2,5 ml in provetta PAXgene per estrazione RNA
    - \* 6 ml x 2 provette con EDTA per preparazione di plasma, buffy coat e globuli rossi
    - \* 6 ml x 2 provette con eparina per linfociti da immortalizzare
    - \* 6 ml x 2 provette per preparazione siero
  - \* 18 ml totali per la **BIOBANCA LOCALE** di cui:
    - \* 6 ml x 1 provetta con EDTA per estrazione DNA
    - \* 6 ml x 1 provette con Sodio Citrato per preparazione di plasma
    - \* 6 ml x 1 provetta per preparazione siero
- **CSF**
  - \* 16 ml totali di cui:
    - \* 9 ml per la **BIOBANCA LOCALE**
    - \* 7 ml per **BIOBANCA CENTRALIZZATA**
- **Urina**
  - \* 10 ml x 2 provette per la **BIOBANCA CENTRALIZZATA**
- **Fibroblasti in coltura:** Prelievo cute con punch da 3 mm; 4 criovials corrispondenti a 2 flask da 75 cm<sup>2</sup> al passaggio p2 o p3 per la **BIOBANCA CENTRALIZZATA**

Le analisi biochimiche da eseguire sul campione di CSF sono i livelli di Ab<sub>1-42</sub>, tau totale e phospho-tau<sub>181</sub>.

Le analisi genetiche da eseguire sui campioni di sangue sono lo studio dei geni MAPT, GRN e C9ORF72, seguendo la seguente flowchart:



## **PROCEDURE PER IL PRELIEVO E PROCESSAZIONE DEL SANGUE**

- **2 Provette con EDTA per Plasma, Buffy Coat e Globuli Rossi (6 ml x 2; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**
  - Centrifugare a 2000 x g per 15 minuti, T ambiente
  - Prelevare il plasma, trasferirlo in provette di polipropilene (aliquote da 0.5 ml x 8 provette), congelare e conservare a -80°C.
  - Prelevare buffy coat (quanto più possibile fino ad un max di 0,5 ml x 2 provette) e globuli rossi (aliquote da 0.5ml x 6 provette), trasferirli nelle provette di polipropilene Sarstedt, congelare e conservare a -80°C
  
- **2 Provette per siero (6 ml x 2; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**
  - Sierare per 30 minuti a T ambiente
  - Centrifugare a 2000 x g per 15minuti, T ambiente
  - Prelevare il siero, trasferirlo nelle provette di polipropilene Sarstedt (aliquote da 0.5 ml, per 6 provette), congelare e conservare a -80°C
  
- **3 Provette con EDTA per estrazione di DNA (6 ml x 3; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

### **Estrazione di linfociti da sangue intero (in EDTA)**

- Mettere in un tubo Arnika (tubo da 50 ml con filtro) 15 ml di Ficoll-Istopaque e centrifugare alla velocità massima 5' per far scendere il Ficoll sotto il filtro.
- Aggiungere il sangue intero non diluito e centrifugare a 1400xg per 15 minuti. Si formerà un anello linfocitario (buffy coat) al di sopra del filtro, immerso nel plasma.
- Versare il surnatante contenente l'anello linfocitario in un tubo da 50 ml e centrifugare a 1800xg per pellettare i linfociti.
- Buttare il surnatante, risospendere il pellet linfocitario con 10 ml di PBS 1X e mettere il tutto in un tubo da 15ml. Centrifugare di nuovo a 1800xg per 15 min.
- Buttare il surnatante, lasciare asciugare e conservare il pellet di cellule a -20°C per la successiva estrazione del DNA.

### **Estrazione DNA da linfociti**

- Aggiungere 3 ml di lysis buffer, 500 µl di PK solution e 200 µl di SDS 10%
- Mettere o.n. a 37°C
- Il giorno dopo aggiungere 1 ml di NaCl 6M
- Vortexare 30 sec.
- Centrifugare 15' a 1100xg
- Prelevare il surnatante limpido e aggiungere 3 volumi di etanolo 100% freddo
- Si dovrebbe vedere il filamento di DNA --> prelevarlo (con la minore quantità possibile di liquido) e metterlo in una provetta da 1,5 ml. Centrifugare e buttare il surnatante.
- Lavare il pellet di DNA con 300 µl di etanolo 70% (aggiungere l'etanolo e rimuoverlo dopo centrifugazione).
- Lasciare asciugare
- Risospendere in 150 µl di TE 1X: 50 µl per l'analisi genetica e 100 µl per banca. Trasferire il campione destinato alla BIOBANCA CENTRALIZZATA in 2 provette di polipropilene della Sarstedt (50 µl per provetta) e segnare sulle provette la concentrazione di DNA

LYSIS BUFFER: TrisHCl 10 mM pH 8, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM

PK SOLUTION: 2 mg di proteinasi K in 1 ml di soluzione di SDS 1% e EDTA 2 mM.

#### ➤ **1 Provetta PAXgene per estrazione RNA (per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Tenere i campioni a T ambiente per 2 ore prima di congelarli a -20°C. Dopo 24 ore a -20°C, trasferirli a -80°C

#### ➤ **2 Provette con eparina per estrazione dei linfociti da immortalizzare (6ml x 2; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Lavorare in condizioni di sterilità
- In un tubo da 50 ml mettere 20ml di Ficoll.
- Versare 12 ml di sangue (in eparina) in un tubo da 50ml e aggiungere 8 ml di PBS 1X (risospendere bene)



- Stratificare il sangue sul Ficoll molto lentamente (il sangue deve rimanere sopra il Ficoll)
- Centrifugare 35 min a 800 x g con accelerazione e decelerazione basse
- Aspirare l'anello linfocitario e il plasma in modo circolare e mettere in un nuovo tubo da 50ml
- Centrifugare 1100 x g 15 min
- Buttare il surnatante e al pellet linfocitario aggiungere 5ml di PBS 1X, agitare con la mano e centrifugare a 1100 x g 15 min
- Buttare il surnatante
- Risospesione bene (se i linfociti non vengono risospesi bene si formano dei grumi che non si immortalizzano) in 2 ml di medium di congelamento (1,8 ml FBS + 200µl DMSO), aliquotare in 2 criovials e mettere a -80°C e poi in azoto

## **PROCEDURE PER COLTURA DI FIBROBLASTI** **(per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Ogni laboratorio può adottare i propri protocolli per la coltura dei fibroblasti
- Inviare alla BIOBANCA CENTRALIZZATA 4 criovials corrispondenti a 2 flask da 75 cm<sup>2</sup> al passaggio p2 o p3

## **PROCEDURE PER IL PRELIEVO E PROCESSAZIONE DEL CSF** **(16 ml totali)**

- Puntura lombare in posizione seduta alle 8.00 del mattino
- Prelevare 16 ml di CSF, di cui
  - \* primi 2 ml per analisi di routine (conta cellule, glucosio e proteine tot, IEF)
  - \* 7 ml per la BIOBANCA CENTRALIZZATA (divisi in 14 aliquote da 0.5 ml)
  - \* 7 ml da conservare presso la BIOBANCA LOCALE
- Scartare campioni ematici, o, in caso di campione ematico, centrifugare a 2000g per 5 minuti entro 1 ora dal prelievo
- Aliquotare i campioni destinati alla BIOBANCA CENTRALIZZATA nelle provette di polipropilene della Sarstedt e congelare a -80°C fino al trasferimento

## **PROCEDURE PER IL PRELIEVO DELL'URINA** **(20 ml; per BIOBANCA CENTRALIZZATA)**

- Prelevare l'urina al mattino, verso le 8 del mattino
- Centrifugare a 2000 x g per 15 minuti
- Aliquotare in due tubi di polipropilene da 10ml, congelare e conservare a -80°C

**SINOSI: MATERIALE**

<b>TIPO DI CAMPIONE</b>	<b>QUANTITA'</b>	<b>UTILIZZO</b>	<b>QUOTA SANGUE PER BIOBANCA LOCALE</b>
SANGUE (6ml)	1 provetta con EDTA	Estrazione DNA	<i>Centro-Specifico</i> (FBF-Brescia: 500 µl di DNA genomico)
SANGUE (6ml)	1 provette con Sodio Citrato	Estrazione Plasma	<i>Centro-Specifico</i> (FBF-Brescia: 2-4 ml di plasma)
SANGUE (6ml)	1 provetta	Estrazione Siero	<i>Centro-Specifico</i> (FBF-Brescia: 2-4 ml di siero)

**TOTALE: 18 ml di SANGUE per BIOBANCA LOCALE**

<b>TIPO DI CAMPIONE</b>	<b>QUANTITA'</b>	<b>UTILIZZO</b>	<b>N° PROVETTE PER BIOBANCA CENTRALIZZATA</b>
SANGUE (18ml)	3 provette con EDTA (6ml x 3=18ml)	Estrazione DNA	50 µl x 2 provette Sarstedt
SANGUE (12ml)	2 provette con EDTA (6ml x 2=12ml)	Estrazione Plasma	0.5 ml x 8 provette Sarstedt
		Estrazione Buffy coat	0.5 ml x 2 provette Sarstedt
		Estrazione Globuli rossi	0.5 ml x 6 provette Sarstedt
SANGUE (12ml)	2 provette con eparina (6ml x 2=12ml)	Linfociti da immortalizzare	1 ml x 2 provette Sarstedt
SANGUE (12ml)	2 provette per siero (6ml x 2=12ml)	Estrazione siero	0.5 ml x 6 provette Sarstedt
SANGUE (2,5ml)	1 provetta Paxgene (2,5ml)	Estrazione RNA	1 provetta Paxgene

**TOTALE: 57 ml di SANGUE per BIOBANCA CENTRALIZZATA**

<b>TIPO DI CAMPIONE</b>	<b>QUANTITA'</b>	<b>UTILIZZO</b>	<b>N° PROVETTE PER BIOBANCA CENTRALIZZATA</b>
CSF (16 ml)	2 ml	Per analisi di routine	
	7 ml	Per il centro di prelievo	
	7 ml	Per BIOBANCA CENTRALIZZATA	0.5 ml x 14 provette Sarstedt

**TOTALE: 16 ml di CSF**

URINA (20ml)	20 ml	Per BIOBANCA CENTRALIZZATA	10 ml x 2 provette Falcon
--------------	-------	----------------------------	---------------------------

**TOTALE: 20 ml di URINA**

FIBROBLASTI	2 flask da 75 cm <sup>2</sup> al passaggio p2 o p3	Per BIOBANCA CENTRALIZZATA	4 provette Sarstedt
-------------	--	----------------------------	---------------------

**Usare solo provette di polipropilene e provette Sarstedt (micro tube 2.0ml with screw cap, cod: 72.694.007) per materiale destinato alla BIOBANCA CENTRALIZZATA**

## **Protocollo II**

---

### **Sezione 2.**

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE***

*Valutazione Clinica e Neuropsicologica*

## **VALUTAZIONE CLINICA E NEUROPSICOLOGICA**

### **Valutazione Medica e Neurologica**

- Valutazione dell'Età di insorgenza
- Segni Vitali (pressione arteriosa, pulsazioni, respirazione, temperatura corporea)
- Esami Fisici
- Esame Obiettivo Neurologico

### **Raccolta informazioni anamnestiche per paziente e rispettivi familiari / fonte collaterale**

- Informazioni demografiche del partecipante
- Informazioni demografiche dell'informatore
- Storia familiare del partecipante
- Storia Medica / Stato di Salute del partecipante

### **Valutazione Clinica**

- Cambridge Behavioural Inventory – Revised
- Frontotemporal Dementia Rating Scale (solo per il paziente)
- ALS Functional Rating Scale Revised (solo in caso di diagnosi di Sclerosi laterale Amiotrofica)
- Modified Interpersonal Reactivity Index
- Revised Self-Monitoring Scale

### **Valutazione Psicometrica comune per soggetto paziente e per i propri familiari**

- Mini Mental State Examination (MMSE)
- Figura di Benson (*riproduzione e rievocazione differita*)
  - Span di cifre (diretto ed inverso)
- Camel and Cactus Test
- Fluenza verbale (per lettera e per categoria)
- Trail Making Test (TMT-A e TMT-B)- Dygit Symbol (WAIS-R)
- Boston Naming Test- Free and Cued Selective Reminding Test (*rievocazione immediata e differita*)
- D-KEFS Color-Word Interference Test
- Disegno con i cubi (WAIS-R)
- Mini Social Cognition and Emotion Assessment

## **Protocollo II**

---

### **Sezione 3.**

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE***

*Esami di Neurofisiologia*

## EEG

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di un elettroencefalogramma secondo due condizioni: occhi chiusi e occhi aperti.

**Orario di registrazione:** tarda mattinata.

Verrà effettuata una valutazione preliminare delle condizioni del soggetto, prima dell'esecuzione dell'EEG. Essa riguarderà la capacità uditiva del soggetto (1000 Hz-tone a 40 dB), e l'uso di agenti psicoattivi utilizzati in genere e nelle 24 ore prima dell'esecuzione dell'esame (cibo, alcoolici, nicotina, caffeina, teina e altri stimolanti). Farmaci come benzodiazepine, antidepressivi e antiipertensivi devono essere sospesi almeno 24 prima dell'esecuzione dell'esame. Verrà poi eseguita una breve intervista attraverso la somministrazione della **Substance Consumption Scale** e della **Epworth Sleepiness Scale**, volta a indagare la qualità del sonno in generale e nella notte precedente all'esecuzione dell'esame.

Di seguito sono riportate le procedure per la registrazione EEG:

**POSITION OF SUBJECTS FOR EEG RECORDING.** Subjects will be seated on a semi-reclined armchair.

**EEG MONTAGE.** To reduce the time of the EEG montage, we use a minimum of 19 standard electrodes placed according to basic 10-20 system (Jasper, 1958; (i.e. Fp1, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, T3, C3, Cz, C4, T4, T5, P3, Pz, P4, T6, O1, O2). A higher number of EEG electrodes extending the basic 10-20 system is appreciated (i.e. TP9 and TP10 electrodes), especially for P300 recordings.

For all EEG recordings, the use of linked earlobe reference electrode are highly appreciated, since the computation of direct transfer function (DTF) for the evaluation of directional functional coupling of EEG rhythms requires extra-cephalic electrode reference. Of note, recorded EEG data will be off-line re-referenced to common average (i.e. a reference free montage) for the EEG source analysis and spectral coherence. Ground electrode should be preferably placed between Fz and Cz electrodes. Resistance of the EEG electrodes should be less than 5 KOhm. Noteworthy, all impedances across electrodes should be quite similar for a valid subsequent EEG data analysis.

**EOG MONTAGE.** Bipolar vertical and horizontal EOGs will be used (see Figure 1); resistance should be lower than 20 KOhm.

**EKG MONTAGE.** A standard pericardiac EKG channel using V6 derivation referenced to right ankle (see Figure 3 for the positioning of V6) should be used for the computation of heart rate variability according to the international guidelines (i.e. R peak is especially well shaped), rough evaluation of cardiac activity, and for the mathematical removal of possible EKG artifacts on EEG traces not detected at the moment of the EEG recording. The position at the trunk of the V6 derivation allows a EKG recording free from artifacts during the hand motor task planned in the auditory oddball paradigm. The EEG recording will start when the quality of EEG recordings is acceptable as judged by an expert of EEG recordings.

**RECORDING SAMPLING for EEG-EOG-EKG.** About 512 Hz frequency sampling will be used (anti-aliasing 0.16Hz-128 Hz pass-band) to ensure EKG recording to be used for the computation of heart rate variability according to the international guidelines. A higher sampling frequency to 1000 Hz (anti-aliasing 0.16Hz-256 Hz pass-band) is appreciated especially for non linear EEG analysis). No notch filter will be on the recorded EEG data. Due to intrinsic technical limitations, EEG equipments for the night sleep recordings may not support frequency sampling of 512 Hz in WP1-sleep deprivation challenge. In that case, about 400 Hz frequency sampling is used for EEG recordings.



**ASSESSMENT OF THE SUBJECT'S CONDITION DURING EEG RECORDING.** A main problem in the protocol is to avoid sleeping onset during eyes-closed condition. In order to keep constant the level of vigilance, an operator will control on-line the subject and the EEG traces, verbally alerting the subject any time there were signs of behavioral (loss of muscular tone) and/or EEG (slowing of EEG with K complexes and sleep spindles) drowsiness. In the case of these signs, the experimenters will talk to subject up to the normalization of EEG (they mark the episode on the corresponding EEG traces).

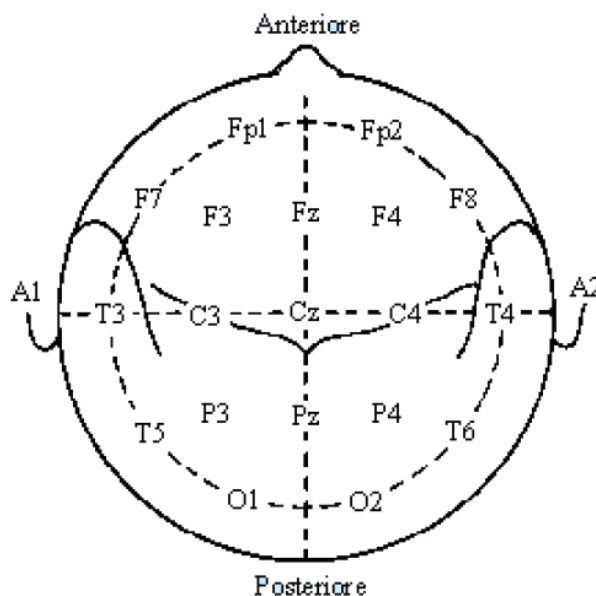
**RESTING STATE EEG conditions (MANDATORY, max duration of about 10 minutes)**

EEG experiment starts with the resting state EEG conditions:

1) Resting state eyes closed EEG recording for at least 3 minutes (maximum 5 minutes; the duration is established on the basis of the tolerance of experimental subject; ideally, 5 minutes of EEG recordings should be recorded)

(At the end of the resting state eyes closed condition, subjects are asked to open the eyes; pause of 30 seconds at eyes open)

2) Resting state eyes open EEG recording for at least 3 minutes (maximum 5 minutes; see above comment for eyes closed condition)



**Fig. 1**

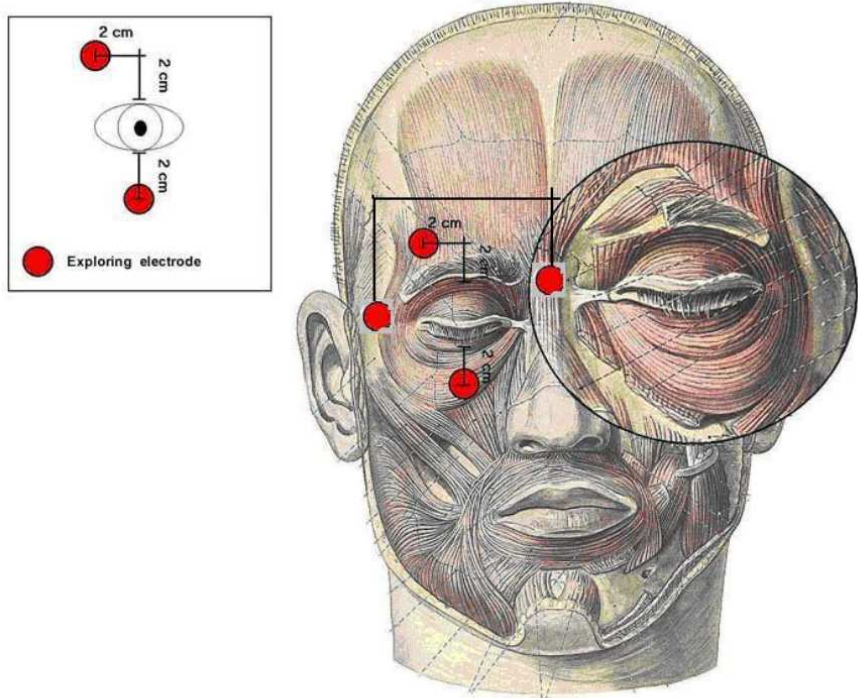


Fig. 2

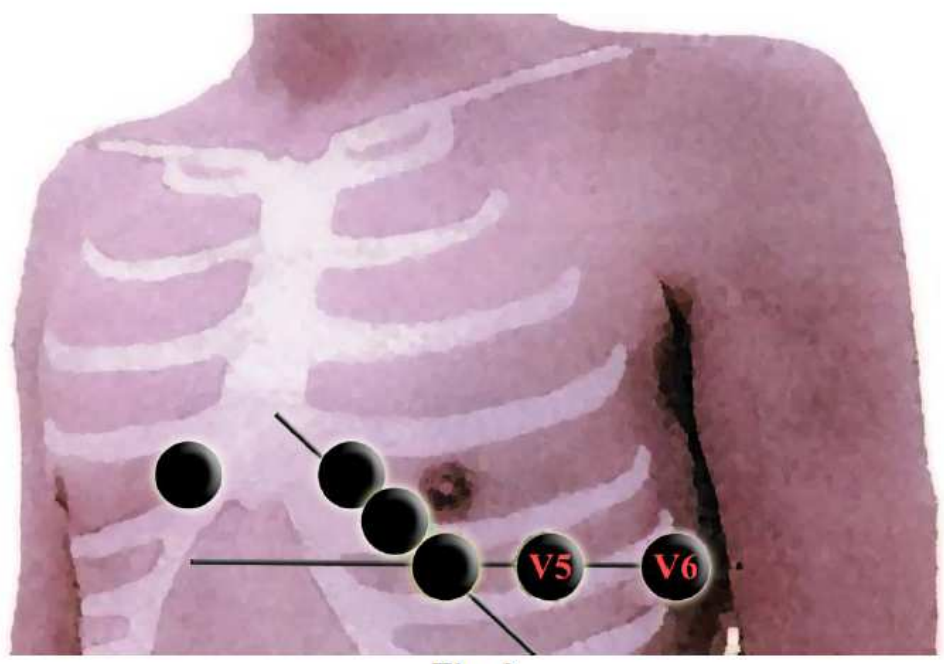


Fig. 3

## **Protocollo II**

---

### **Sezione 4.**

**PROTOCOLLO ARMONIZZATO  
RICERCA**

**Italian D I A *f* N**

***PROCEDURA per le FORME FAMILIARI di  
DEGENERAZIONE LOBARE FRONTOTEMPORALE***

*Esami di Neuroimmagine*

## RISONANZA MAGNETICA

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di una risonanza magnetica a 3 Tesla con le sequenze riportate di seguito:

- T1 volumetrica
- T2 volumetrica
- Diffusion Tensor Imaging (DTI)
- risonanza funzionale a riposo (fMRI)
- arterial spin label (ASL)

Le procedure di acquisizione sono armonizzate al protocollo GENFI-2

## **PET con FLUORODESOSSIGUCOSIO (FDG-PET)**

Il protocollo ItalianDIAfN prevede l'esecuzione di una PET con fluorodesossiglucosio per lo studio della funzione cerebrale nelle diverse aree coinvolte nella genesi dei disturbi cognitivi.

Le procedure di acquisizione sono armonizzate al protocollo US DIAN ed le specifiche si faccia riferimento al documento al seguente link:

<http://www.dian-info.org/resourcedb/PDFs/PET%20Manual.pdf>