

10.2.g

**Van:** secretariaat DEC 10.2.g  
**Verzonden:** maandag 7 augustus 2017 13:30  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: vragen bij de behandeling van AVD10.2.g 20171046

**Categorieën:** Dossier: 10.2.e Dossier: 10.2.e

Geachte CCD,

Zojuist heb ik via WebFTP, namens de verantwoordelijk onderzoeker, het geformuleerde antwoord op uw vragen naar de CCD gestuurd.

De 10.2.g ziet geen reden om haar advies n.a.v. het antwoord aan te passen.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e en 10.2.g

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** maandag 10 juli 2017 9:44  
**To:** 10.2.e en 10.2.g ; secretariaat DEC  
**Subject:** vragen bij de behandeling van AVD10.2.g 20171046

15

Geachte 10.2.e en 10.2.g

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan, uw aanvraag is op 30 juni in de vergadering besproken en hierbij zijn er nog een paar vragen. Wij willen u vragen aanvullende informatie over deze openstaande punten aan te leveren pas daarna kan de behandeling van uw aanvraag afgerond worden. Het betreft uw aanvraag: Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind, met aanvraagnummer AVD10.2.g 20171046.

- 1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?
- 2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.

De vergadering van de CCD was verplaatst van 23 juni naar 30 juni, daarom heeft het een week langer geduurd voor wij u bericht sturen over de voortgang van uw dossier. ,

Met vriendelijke groet, 10.2.e

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
**Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag**  
 .....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

AVD 10.2.g 2017 1046 m.b.t. Aanvullende informatie

Geachte CCD,

Hierbij stuur ik u de gevraagde aanvullende informatie over onze CCD aanvraag.

Met vriendelijke groeten,

10.2.e en 10.2.g

**1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?**

The main reason why we use controlled fluid uptake is that we need to obtain a sufficiently large number of trials per session (typically >600 trials per session), for two reasons. First, we need reliable measures of the animals' perception of visual stimuli and electrically induced neuronal activity. Accurate measures of perception and of phosphene thresholds demand a large number of trials. Second, we obtain a larger number of trials to study the activity of neurons. The activity of neurons is inherently stochastic, i.e. the responses of a cell to repetitions of the same stimulus are variable, a stochasticity that is inherent to proper brain function. Controlled fluid access is by the far the most common method to motivate animals to perform cognitive tasks. We note that only healthy and cooperative monkeys that are at ease will perform these tasks in which they make eye (or arm) movements. Alternative methods have been described by a workgroup for the British NC3R center (National Center for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010):

*Positive reinforcement with fruit juice without controlled fluid uptake.* We use this approach in the early phases of training. The animals receive a small amount of fruit juice for each correct trial they perform. In the initial training phases this approach is sufficient to motivate the animals to perform very simple tasks. However, as task difficulty and the amount of effort required by the animal increases, most animals do not perform sufficient number of trials.

*Food reinforcement.* Animals can be motivated to learn simple tasks using small treats like peanuts, sometimes in combination with 'clicker training' approaches in which the monkey learns to pair a specific sound with a later reward. These approaches work well for simple tasks requiring less than 100 trials, but the animals quickly satiate. Furthermore, the use of food rewards can disturb brain measurements through movement, chewing etc.

*Electrical stimulation of reward centers in the brain.* In this method an electrode is surgically implanted in reward centers and is electrically stimulated if the animal performs a correct trial (Bichot et al., 2011). However, this method involves an extra surgery with the accompanying risks of complications and direct electrical stimulation of the reward centers may interact with the neural processes that are the main focus of this application.

Controlled fluid uptake is the only method available to obtain sufficient numbers of trials without directly electrically stimulating the brain. We implement controlled fluid uptake in a gradual fashion that adapts the level of fluid control to the behavior of each individual. We begin with positive reinforcement using fruit juice without any controlled fluid uptake and only use fluid control regimes



if the animal is not sufficiently motivated to perform the task with no fluid control. We gradually introduce the fluid control with the aim to have the animals drink as much fluid as possible. Nevertheless, in the majority of animals it is necessary to restrict access to fluid to some level to obtain enough trials on the complex behavioral tasks described in the application.

The controlled fluid access protocol described in the application has been shown to produce only mild discomfort if carried out with due care and extensive monitoring (Prescott et al., 2010; Toth and Gardiner, 2000). Research of the NC3R (Gray et al., 2016) demonstrated that our careful protocol is associated with urine measures indicative of well-functioning, healthy kidneys. Changes in behaviors are limited, the main one being an increase in motivation to drink on the stricter fluid control. Another study (Hage et al., 2014) analyzed a broad range of behaviors over several months during fluid control and found no evidence for alterations in behavior, which indicates that the animals' wellbeing can be stably ensured during training sessions with a proper protocol.

We monitor the behavior, weight and fluid intake of the animal on a daily basis and register all details in an electronic database, which is available to other researchers, caretakers and inspectors. Furthermore, the animals are seen regularly by a veterinarian to inspect their general condition, and we investigate measures of kidney function during the yearly checkups. We have never obtained indications of impaired kidney function. Hence, our own experience is in accordance with the literature, which indicates that a careful protocol of controlled fluid uptake is a safe and effective manner to motivate animals to perform cognitive tasks.

**2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.**

According to the EU directive the definition of severe discomfort is:

*“Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience severe pain, suffering or distress, or long-lasting moderate pain, suffering or distress. Procedures, that are likely to cause severe impairment of the wellbeing or general condition of the animals.”*

The monkeys will undergo surgical procedures, which lead to, at most, moderate discomfort that is mostly associated with the recovery from anesthesia and lasts a maximum period of 1-2 days. The animals receive strong opioid painkillers for several days after each surgery and do not experience pain. We use advanced anesthetic approaches in which an antagonist to the anesthetic agent is given at the end of the surgery. This leads to very fast recovery times compared to more traditional anesthetics and the animals are alert after 1h. They resume eating the same day or occasionally on the next day. The discomfort associated with these surgeries is therefore at the lower end of moderate and we can exclude that the animals suffer acute severe discomfort due to the surgical procedures.

The second part of the definition refers to a situation with ‘long-lasting moderate pain, suffering and distress’. One question might be whether the successive procedures would cause cumulative suffering that is more than that caused by the individual procedures. There is no indication that this is the case. One report has been published that specifically addresses this concern (Pickard, 2013). The report of the Animal Procedures Committee by the UK government states:

*“Specifically, there was little evidence in the majority of non-human primates to suggest that “the nature of pain, suffering, distress, and its intensity, the duration, frequency and multiplicity of techniques employed” and the “cumulative suffering within a procedure after applying all appropriate refinement techniques” (Directive 2010/63/EU) should have increased the severity assessment over that for single events/procedures alone”.*

The report also indicates that there was no increase in discomfort through incomplete recovery between events ('stacking') or potentiation of adverse effects and suffering by earlier procedures. Many animals instead showed signs of diminished responses to repeated procedures such as restraint and handling.

Furthermore, we have taken several measures to exclude the possibility that the cumulative discomfort can exceed the moderate level:

*Extensive monitoring.* The behavior and health of the animal is carefully monitored by the researchers, the care-takers and experienced vets and entered in an electronic database, which includes the general appearance of the animal, its weight and the amount of food/drink. In its advice, the DEC stated “echter de volledige lijst van alle ingrepen en de langdurige gedragstaken over 4 jaar is dusdanig lang dat dat de effecten ervan op het dier niet met zekerheid zijn te voorspellen”. Upon request, the chairman of the DEC clarified that this concern related to the possible longer-term ethological and psychological effects on the animals' wellbeing (i.e. not to the animals' medical condition). Although it is very unlikely that these factors could cause cumulative discomfort to exceed the moderate level given the animals' environment (see below under *social housing*), and because the behavior of animals that participate in these experiments is virtually indistinguishable from the behavior of animals that do not, we will ask the opinion of an expert monkey ethologist on a regular basis. If there is a threat that the future cumulative discomfort level of an individual animal might exceed moderate (for medical or psychological/ethologic reasons), the animal will be taken out of the experiment (re-homed or euthanized) thereby excluding the possibility of severe cumulative discomfort.

*Long recovery times between surgeries.* Surgical procedures are followed by a minimum of four weeks of recovery. In practice, the interval between the head-post surgery and the implantation of the intracranial implant is at least 6 months, and in the interval between the implantation of the optional baseplate and the intracranial implant at least 3 months. These long intervals ensure the monkeys have fully recovered after the surgeries before any further interventions take place. There is no question of 'stacking' of discomfort due to surgeries close in time.

*Well-integrated surgical implants.* The implants we now use are custom designed for each animal, 3D printed in biocompatible titanium and placed in a sterile operating theatre of the highest standards. The implants integrate well with the bone and the skin and fur grows back fully around the implant. The rate of complications related to these implants is very low.

*Social housing of a high standard.* The animals live in stable social pairs in large floor-to-ceiling cages with natural daylight. The cages are enriched with toys and puzzles and the animals engage in their natural behaviors such as grooming, climbing and foraging for food (e.g. for peanuts hidden in the sawdust on the floor). We see no evidence for stereotypical movements or any evidence that long-term housing causes any suffering for the animals.

*Controlled fluid protocol approach.* Our approach to controlled fluid uptake is to use the mildest form of fluid control necessary to achieve the desired performance of the animal. In the answer to the question above we outlined why the amount of discomfort associated with this procedure is maximally mild.



Given these considerations, the level of discomfort associated with the procedures is maximally moderate and the cumulative level of discomfort experienced by the animals is also moderate. Indeed, the DEC stated: *“Het is echter de vraag of het cumulatieve ongerief om die reden hoger ingeschat moet worden dan het matige ongerief van de afzonderlijke handelingen en dus bijvoorbeeld ingeschat zou moeten worden als ernstig. De DEC meent dat waarnemingen bij eerdere experimenten van vergelijkbare aard in bij de aanvragende instelling geen feiten en omstandigheden hebben opgeleverd die aan die opvatting concrete steun geven. De DEC heeft hierover aanvullende informatie opgevraagd aan de IvD. De IvD heeft op basis van eigen ervaringen met de al lopende proeven aangegeven het ongerief te zien als cumulatief matig. De IvD is tevens van mening dat, juist door het langzaam gewennen van de dieren aan de huisvesting en de gedragstaken, er een situatie ontstaat waarbij de dieren coöperatief zijn en dat er geen sprake is van een grote psychische of fysieke belasting van de dieren tijdens de uitvoering van de gedragstaken.”* The (cumulative) discomfort level classification ‘moderate’ is also in accordance with the opinion of (1) our vets, who have ample experience with experiments in monkeys and rate the cumulative discomfort as moderate, (2) we inspected the retrospective assessments of the discomfort experienced by monkeys in similar experiments of the previous five years, and found that they have always been in the moderate category, (3) the opinion of the IvD and (4) our DEC protocols under the previous law have always been at the moderate discomfort level while using similar techniques. The discomfort level has actually become lower over the years, due to refinements of the implants, anesthesia protocols, measurement techniques and enrichments in the monkeys’ environment.

In conclusion, classification of the Animal Procedures as severe discomfort would not be in line with the EU directive given that severe discomfort is reserved for experiments where animals are likely to experience severe pain, suffering or distress, or long-lasting moderate pain, suffering or distress. In the current project application, we have taken measures that ensure that acute and cumulative discomfort levels cannot exceed the moderate level. Even though this is unlikely, as was outlined in the above, if there is a threat that the future cumulative discomfort level of an individual animal might exceed moderate (for medical or psychological/ethologic reasons), the animal will be taken out the experiment, thus effectively excluding the possibility of severe cumulative discomfort.

In case of remaining questions about the use of a controlled water intake protocol or about estimated discomfort levels, we would be happy to exchange ideas about these issues with members of the CCD.

### References

- Bichot, N.P., Heard, M.T., Desimone, R., 2011. Stimulation of the nucleus accumbens as behavioral reward in awake behaving monkeys. *J. Neurosci. Methods* 199, 265–272.
- Gray, H., Bertrand, H., Mindus, C., Flecknell, P., Rowe, C., Thiele, A., 2016. Physiological, Behavioral, and Scientific Impact of Different Fluid Control Protocols in the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). *eNeuro* 3.
- Hage, S.R., Ott, T., Eiselt, A.-K., Jacob, S.N., Nieder, A., 2014. Ethograms indicate stable well-being during prolonged training phases in rhesus monkeys used in neurophysiological research. *Lab. Anim.* 48, 82–87.
- Pickard, J., 2013. Review of the assessment of cumulative severity and lifetime experience in non-human primates used in neuroscience research.  
[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/261687](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/261687)

/cs\_nhp\_review\_FINAL\_2013\_corrected.pdf

Prescott, M.J., Brown, V.J., Flecknell, P.A., Gaffan, D., Garrod, K., Lemon, R.N., Parker, A.J., Ryder, K., Schultz, W., Scott, L., Watson, J., Whitfield, L., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *J. Neurosci. Methods* 193, 167–188.

Toth, L.A., Gardiner, T.W., 2000. Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 39, 9–17.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

**Contactpersoon**  
10.2.e

info@zbo-ccd.nl

Betreft: Advies AVD20171046 na aanvullende informatie aanvrager

In de CCD vergadering van 30 juni 2017 is de projectvergunningaanvraag met als titel 'Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind' besproken.

### **Beslissing**

Het bestuur was van mening dat het toepassen van vochtdeprivatie niet voldoende was onderbouwd. Daarnaast was het bestuur van mening dat het in de aanvraag beschreven cumulatief ongerief ook als ernstig gezien kunnen worden in plaats van matig zoals nu geclassificeerd.

Om bovenstaande redenen is besloten de aanvraag aan te houden en aanvullende informatie op te vragen bij de aanvrager.

Het Secretariaat heeft de aanvrager vervolgens onderstaande vragen gesteld:

- 1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?
- 2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.

### **Aanvullende informatie**

Op 7 augustus 2017 heeft de aanvrager aanvullende informatie verstrekt. Deze informatie is meegestuurd als vergaderstuk AVD20171046g\_Aanvullende informatie aanvrager.

De aanvrager heeft onderbouwd waarom vochtdeprivatie nodig is en waarom het niet mogelijk is minder ingrijpende methoden te gebruiken om dieren te trainen/motiveren. De aanvrager heeft daarnaast onderbouwd waarom het ongerief niet als ernstig geclassificeerd zou moeten worden.

Het Secretariaat heeft bij de NVWA nagevraagd hoe dergelijke proeven tot dusverre zijn geclassificeerd. Uit de registratie blijkt dat in 2015 en 2016 deze proeven als matig ongerief zijn geclassificeerd. Hierbij acht de NVWA het van belang dat de dieren vooraf geselecteerd worden op geschiktheid, geborgd wordt dat dieren maximaal een milde druk

ondervinden van de vochtdeprivatie en dat dieren langzaam gewend worden aan de deprivatie. Zie het aanvraag AVD20172425 (AVD20172425b\_AdviesNotaCCD) voor de volledige reactie van de NVWA.

### **Samenvatting**

Het Secretariaat is van mening dat 11.1

Het Secretariaat is van mening dat 11.1

Daarnaast is het Secretariaat van mening dat 11.1

### **Voorstel Besluit**

Het Secretariaat adviseert 11.1

Het Secretariaat adviseert om 11.1



11.1

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g  
TU.2.e en TU.2.g

10.2.g



Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD 10.2.g 0171046  
Bijlagen  
1

Datum 31 augustus 2017  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Op 2 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 0171046. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 7 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 10 juli 2017 hebben wij u vragen gesteld over deprivatie en de ongeriefclassificatie. Wij kunnen ons vinden in uw reactie.

#### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

-U geeft aan dat dieren, vanwege de lange duur van de experimenten (>1 jaar) tijdens de uitvoering van de proef al ingezet worden voor andere proeven. De DEC benoemt dit als dilemma, omdat het gebruik van dieren in andere proeven mogelijk ook additionele operaties vereist waardoor het cumulatieve ongerief voor het individuele dier kan toenemen. Aangezien de proef nog niet beëindigd is, zou het ongerief veroorzaakt door de handelingen meegenomen moeten worden bij de bepaling van het cumulatieve ongerief. Anderzijds leidt dit tot vermindering van het aantal dieren. Wij zijn het met de DEC eens dat dit een dilemma is: weegt vermindering zwaarder dan een toename van het ongerief bij individuele dieren? Bovendien kan het uitvoeren van additionele handelingen aan dieren voor andere doeleinden het behalen van de doelstelling in gevaar brengen. Dit



bemoelijkte de ethische afweging. Aangezien er geen inzicht is gegeven in de doelstellingen waar de dieren additioneel voor gebruikt worden, er geen inzicht is in het ongerief dat de dieren als gevolg van de additionele handelingen ondergaan en er geen inzicht is op het effect van de additionele handelingen op de haalbaarheid van de proeven in deze aanvraag, kunnen wij het gebruik van dieren voor additionele handelingen tijdens de proef op dit moment niet toe staan. Indien u additionele handelingen wil uitvoeren, dient u in lijn met de beleidsregels 'Meldingen in het kader van een projectvergunning' een nieuwe aanvraag in te dienen voor onderzoek naar additionele doeleinden. In deze aanvraag dient aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. Wij zullen op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

**Datum:**  
31 augustus 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD 10.2.g 0171046

-U geeft aan dat er overlap is met lopende DEC protocollen. Om overlap te voorkomen, is een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd waarbij na vergunning van deze aanvraag dieren en experimenten uit eerder goedgekeurde DEC protocollen formeel onder deze vergunning gaan vallen.

U kunt met uw project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind" starten. De vergunning wordt afgegeven van 31 augustus 2017 tot en met 1 juli 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie 10.2.g gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

10.2.g

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 31 augustus 2017 tot en met 1 juli 2022, voor het project "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind" met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20171046, volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Voor aanvullende voorwaarden, zie samenvatting.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 juni 2017;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 juni 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 mei 2017, ontvangen op 2 juni 2017.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
<b>3.4.4.1. Visual prosthesis development and phosphene tasks</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	7	100% Matig	
<b>3.4.4.2. Intracranial implants and performance on complex tasks</b>				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	7	Matig	

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk juli 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.



**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Datum:  
31 augustus 2017  
Aanvraagnummer:  
AVD 10.2.g 20171046

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

10.2.e

Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

- Vergunning
- Hiervan deel uitmakend:
  - DEC-advies
  - Weergave wet- en regelgeving

**Aanvraagnummer:**

AVD10.2.g0171046

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

- Het is niet toegestaan handelingen voor additionele doeleinden uit te voeren bij dieren voor beëindiging van de proeven.

-Voor het uitvoeren van handelingen voor additionele doeleinden dient een separate vergunningsaanvraag te worden ingediend. In deze aanvraag dient te worden vermeld dat dieren gebruikt zullen worden die onder deze vergunning vallen en dat de handelingen plaats zullen vinden voor de proef beëindigd is. In deze aanvraag dient verder aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. De CCD zal op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan voor de CCD aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

- Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u ook in de aanvraag heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.





Aanvraagnummer:  
AVD 10.2.g 0171046

## Weergave wet- en regelgeving

### Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

### Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de Instantie voor dierenwelzijn.

### Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

**Aanvraagnummer:**

AVD 10.2.g:0171046

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

#### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

#### **Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.



**Van:** Info-zbo  
**Aan:** "secretariaat DEC"  
**Onderwerp:** terugkoppeling: AVC10.2.g20171046  
**Datum:** vrijdag 20 oktober 2017 16:16:26

Geachte DEC,

Op 2 juni 2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project met aanvraagnummer AVC10.2.g20171046.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De CCD heeft onderstaande voorwaarden verbonden aan de vergunning:

- Het is niet toegestaan handelingen voor additionele doeleinden uit te voeren bij dieren voor beëindiging van de proeven.

-Voor het uitvoeren van handelingen voor additionele doeleinden dient een separate vergunningsaanvraag te worden ingediend. In deze aanvraag dient te worden vermeld dat dieren gebruikt zullen worden die onder deze vergunning vallen en dat de handelingen plaats zullen vinden voor de proef beëindigd is. In deze aanvraag dient verder aandacht besteed te worden aan de effecten van de additionele handelingen op het cumulatieve ongerief van de dieren en de haalbaarheid van de doelstellingen in de huidige vergunning. De CCD zal op dat moment beoordelen of toegestaan wordt de dieren in de huidige vergunning tijdens de proef te gebruiken voor de additionele doeleinden. Deze beoordeling kan voor de CCD aanleiding zijn de huidige vergunning aan te passen of in te trekken.

- Daar waar er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen zullen de dieren en experimenten na het verlenen van de vergunning

formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u ook in de aanvraag heeft aangegeven.

Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

Wij hebben de aanvrager een aantal aanvullende vragen gesteld. Zie onderstaande e-mail.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing en de vragen die aan de aanvrager gesteld zijn, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

**Van:** Info-zbo

**Verzonden:** maandag 10 juli 2017 9:44

**Aan:** 10.2.e en 10.2.g 'secretariaat DEC'

**Onderwerp:** vragen bij de behandeling van AVC10.2.g20171046

Geachte 10.2.e en 10.2.g

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan, uw aanvraag is op 30 juni in de vergadering besproken en hierbij zijn er nog een paar vragen. Wij willen u vragen aanvullende informatie over deze openstaande punten aan te leveren pas daarna kan de behandeling van uw aanvraag afgerond worden.

Het betreft uw aanvraag: Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind, met aanvraagnummer AVC10.2.g20171046.

- 1) U beschrijft dat u de dieren traint/ motiveert middels vochtdeprivatie. Kunt u meer beschrijven en onderbouwen waarom er geen andere minder belastende methode of positief belonen methode is om de dieren de taken aan te leren?
- 2) Kunt u meer onderbouwen waarom u bent gekomen tot een ongeriefclassificatie van matig? Wanneer alle handelingen (ernst en frequentie) en de duur dat de dieren in de dierproef zijn opgenomen worden samengevoegd is de CCD van mening dat dit cumulatief moet worden gezien als ernstig ongerief.

De vergadering van de CCD was verplaatst van 23 juni naar 30 juni, daarom heeft het een week langer geduurd voor wij u bericht sturen over de voortgang van uw dossier. ,

Met vriendelijke groet, 10.2.e

Namens Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



Inventaris Wob-verzoek W21-01									
nr.	document NTS20173266	reeds openbaar	wordt verstrekt			weigeringsgronden			
			niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier, d.d. 3 oktober 2017				x		x	x	
2	NTS (versie 1)			x					
3	Projectvoorstel				x	x	x	x	
4	Bijlage dierproeven (versie 1)				x	x	x	x	
5	DEC-advies, d.d. 3 oktober 2017				x		x	x	
6	E-mail van CCD aan vergunninghouder - begeleidende e-mail bij ontvangstbevestiging, d.d. 4 oktober 2017				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging, d.d. 4 oktober 2017				x		x	x	
8	Aanvraagformulier - per post verzonden versie - d.d. 5 oktober 2017				x		x	x	
9	E-mail van CCD aan vergunninghouder - verzoek om aanvulling aanvraag, d.d. 30 oktober 2017				x		x	x	
10	Reactie op verzoek om aanvulling van de aanvraag, d.d. 11 november 2017			x					
11	NTS (versie 2)			x					
12	Bijlage dierproeven (versie 2)				x	x	x	x	
13	Adviesnota CCD, d.d. 16 november 2017				x		x	x	x
14	E-mail van CCD aan vergunninghouder - herhaald verzoek om betaling leges, 16 november 2017				x		x	x	

15	Interne e-mail vergunninghouder - bericht van de postkamer, d.d. 16 november 2017				x		x	x	
16	E-mail van vergunninghouder aan CCD - verzoek om factuur (opnieuw) toe te zenden, d.d. 16 november 2017				x		x	x	
17	E-mail van CCD aan vergunninghouder - herhaalde toezending ontvangstbevestiging, d.d. 17 november 2017				x		x	x	
18	Beschikking en vergunning, d.d. 20 november 2017				x		x	x	
19	E-mail van CCD aan DEC - terugkoppeling over advisering, d.d. 27 november 2017				x		x	x	
20	NTS (versie 3)	x							



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10.2.g	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen		
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	10.2.g	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e en 10.2.g	
		KvK-nummer	10.2.g	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer		
		Postbus	10.2.g	
		Postcode en plaats		
		IBAN		
		Tenaamstelling van het rekeningnummer		
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e en 10.2.g	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.e en 10.2.g	
		Afdeling	10.2.e en 10.2.g	
		Telefoonnummer		
		E-mailadres		
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e en 10.2.g	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.e en 10.2.g	
		Afdeling	10.2.e en 10.2.g	
		Telefoonnummer		
		E-mailadres		



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |  |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |  |
| Afdeling                    |  |  |
| Telefoonnummer              |  |  |
| E-mailadres                 |  |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 11 - 2017 |
| Einddatum  | 30 - 10 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Visuele waarneming door optogenetische stimulatie van de hersenschors.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |           |
|-------------|-----------|
| Naam DEC    | DEC10.2.g |
| Postadres   | 10.2.g    |
| E-mailadres |           |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Appendices: AP 3.4.4.1

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	10.2.e en 10.2.g
Functie	10.2.e en 10.2.g
Plaats	10.2.g
Datum	04 - 10 - 2017
Handtekening	



**2****Format****Niet-technische samenvatting**

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

**1 Algemene gegevens**

- |                              |  |
|------------------------------|--|
| 1.1 Titel van het project    | Visuele waarneming door optogenetische stimulatie van de hersenschors  |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar   |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Optogenetica, visuele waarneming, blindheid, perceptie, visuele schors |

**2 Categorie van het project**

- |  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.<br><br><i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek  |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

**3 Projectbeschrijving**

- |   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Blindheid gaat ten koste van de autonomie en (mede daardoor) de kwaliteit van leven van mensen. Soms kan het gezichtsvermogen worden hersteld met behulp van een chip op het netvlies (retinale implantaten), maar vaak biedt dit geen uitkomst omdat de ogen beschadigd zijn, of de verbinding tussen de ogen en het brein is uitgevallen. De enige manier om in dergelijke gevallen het zicht te herstellen is een prothese die de visuele informatie vanuit een camera rechtstreeks overdraagt naar de visuele hersenschors. Camerabeelden worden omgezet in elektrische impulsen van dat deel van ons brein.</p> <p>In ons lab werken wij aan zo'n prothese. In dat verband willen we onderzoeken of het mogelijk is om de visuele hersenschors te stimuleren door gebruik te maken van optogenetica: -t lichtgevoelige receptoren worden ingebouwd in zenuwcellen in de hersenen. Door met een lichtbron te schijnen kunnen de zenuwcellen worden aan- en uitgezet. Deze techniek zou een</p> |
|---|---|

belangrijke aanvulling kunnen zijn op (of een alternatief voor) de techniek die gebruikt maakt van elektrische stimulatie. Optogenetica is nauwkeuriger en kan mogelijk voor een natuurlijker beeld zorgen dan elektrische stimulatie. Optogenetica is echter een nieuwe techniek, waarnaar nog veel onderzoek moet worden gedaan. Met ons onderzoekproject willen we een eerste stap maken. Het lange termijn doel is het ontwikkelen van optogenetische techniek voor toepassing in een visuele prothese en tegelijkertijd kennis verwerven over (1) de beste wijze van optogenetische stimulatie en (2) de relevante mechanismen voor visuele waarneming.

Allereerst testen wij of optogenetische stimulatie van de visuele hersenschors een waarneming kan veroorzaken. We brengen daarbij de duur, frequentie en intensiteit van de stimulatie die leidt tot stabiele waarneming in kaart. Vervolgens bieden we complexere patronen aan de hersenschors aan waarbij sommige cellen worden geactiveerd en andere juist geremd.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Bij veel vormen van blindheid zijn de ogen (of de verbinding tussen ogen en hersenen) beschadigd en kan het zicht niet worden hersteld met netvliesprothesen. Voor deze patiënten is een prothese in de hersenschors een veelbelovende oplossing. Optogenetische technieken kunnen een waardevolle aanvulling zijn op (of een alternatief voor) een prothese op basis van elektrische stimulatie. De techniek zou kunnen leiden tot een betere controle over waar wordt gestimuleerd, welke cellen en hoe lang. Dit kan beelden opleveren met een hogere scherpte en daarmee een natuurlijker beeld voor de blinde patiënt.

Het project zal bovendien bijdragen aan onze wetenschappelijke inzicht in visuele waarneming. Om bij blinde patiënten op de juiste wijze zicht te kunnen bewerkstelligen is kennis over de werking van hersencellen die van invloed zijn op ons zicht van groot belang. De respons van een hersencel op een beeldpunt in de buitenwereld bestaat uit een aantal fasen. We onderzoeken of de verschillende fasen van de respons essentieel zijn bij de bewuste waarneming van dat beeldpunt. Deze kennis is van groot belang voor de werking van de prothese.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor deze experimenten gebruiken we in vijf jaar tijd maximaal 5 resusapen.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Negatieve gevolgen voor het welzijn van proefdieren zijn 1) ongerief als gevolg van de chirurgische ingrepen verricht onder volledige anesthesie en adequate pijnbestrijding, 2) het ondervinden van stress tijdens het aanleren en uitvoeren van de taken; dit gebeurt stap voor stap om stress te verminderen.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Voor de resusapen zal het ongerief matig zijn, omdat voor de proeven operaties onder anesthesie nodig zijn. Dit niveau van matig ongerief is van korte duur. De rest van de tijd dat een aap in de proef zit, is het ongerief licht.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Een deel van de dieren kan participeren in andere proeven of kan na de proef met pensioen (zie het NCad advies over herplaatsing: <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing>). Hergebruik of herplaatsing is afhankelijk van de doelstelling van de specifieke proef. Echter wanneer we inzicht moeten krijgen in de verspreiding van de 'optogenetische eiwitten' in het hersenweefsel wordt de aap gedood om de hersenen te onderzoeken onder de microscoop.





## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Om een visuele prothese te kunnen ontwikkelen moet deze getest worden in de hersenen van een proefdier dat complexe visuele taken kan uitvoeren op vergelijkbaar niveau als de mens. In vitro gekweekt hersenweefsel en computermodellen zijn daarvoor logischerwijs ongeschikt. Daarnaast is het voor het testen van een prothese belangrijk dat het visuele systeem van het proefdier voldoende lijkt op dat van de mens. De visuele hersenschors van knaagdieren is veel kleiner dan die van een mens en is op een andere manier georganiseerd. Daarbij kunnen de dieren niet leren hun ogen te richten op de voor het experiment belangrijke visuele informatie. De functie, organisatie en grootte van de hersenen van apen komen beter overeen met die van mensen, wat voor dit project essentieel is.

### 4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Het is onze ervaring dat we betrouwbare resultaten verkrijgen met twee of maximaal drie apen per experiment. Het voorgestelde aantal apen is het minimale aantal dat nodig is om statistisch betrouwbare resultaten te verkrijgen. Verdere vermindering vindt plaats omdat dezelfde dieren kunnen worden gebruikt in meerdere experimenten.

### 4.3 **Verfijning**

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diertype model(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Alle procedures en de huisvesting van de resusapen zijn erop gericht het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Er is veel bekend over de visuele hersenschors in de resusaap en dit dier is het enige proefdier met een visueel systeem dat voldoende lijkt op dat van de mens om een visuele hersenschorsprothese te kunnen ontwikkelen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

1) We beperken de hoeveelheid stress zoveel mogelijk door de apen geleidelijk te laten wennen aan alle aspecten van de gedragstaken. Dit is ook van belang voor het welzijn van de experimenten, omdat gestreste dieren niet of nauwelijks zullen meewerken.

2) De dieren worden getraind via een regime met gecontroleerde vochtopname. Ze krijgen de benodigde hoeveelheid vocht tijdens de training. We hanteren een zorgvuldig protocol om negatieve effecten van de gecontroleerde vloeistofopname te voorkomen. In onze ervaring leidt dit protocol tot gering ongerief en zijn er geen negatieve gevolgen voor de gezondheid.

3) Alle operaties worden uitgevoerd onder anesthesie door personen die goed zijn opgeleid en een ruime ervaring hebben. Na de operaties worden pijnstillers gebruikt om postoperatieve pijn te voorkomen.

4) De dieren worden sociaal gehuisvest in tweetallen in een verrijkte omgeving, om zo het ongerief van het leven in een kooi te beperken en om de cognitieve vermogens te verbeteren. Indien aan het einde van de proeven de dieren moeten worden gedood, gebeurt dit onder volledige anesthesie.



**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



3

## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Place of execution of experiments:
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

The aim of this project is to investigate the possibility of using optogenetic techniques to create artificial visual percepts. The results from these studies will be used to assess whether it is possible, in the future, to use optogenetic techniques to restore vision to blind patients, and to further

**investigate the neural processes that lead to visual perception. To reach this aim we intend to perform animal experiments with four and maximally five rhesus macaque monkeys (*Macaca mulatta*).**

### **Artificial vision**

Artificial vision refers to the creation of visual percepts by directly stimulating/inhibiting the brain. It has long been hoped that artificial vision could be used to restore a form of vision to patients who are blind or have severely impaired vision due to damage to the eyes. The state-of-the-art approach to creating artificial visual percepts is to use electrical stimulation through implanted electrode-grids applying microampere currents ('microstimulation') directly to the visual cortex. In a previous application to the CCD we described a visual prosthesis consisting of hundreds of microelectrodes, chronically implanted in visual cortex, which could be used to microstimulate visual cortex. Microstimulation above a certain threshold current induces the percept of a small spot of light known as a 'phosphene'. In an ongoing CCD-approved project an artificial visual percept would be built up using hundreds of independently evoked phosphenes, restoring a rudimentary form of vision to blind patients. This approach is promising as the technology already exists to implement such a prosthesis, however there are a number of disadvantages to using microstimulation which will ultimately limit the quality of the visual percept induced by such a prosthesis. The primary disadvantage is that the electrical activity produced by the micro-electrode spreads out from the electrode tip activating both cell-bodies and axons in the vicinity of the electrode. This means that a phosphene will never be smaller than a certain spot size and stimulating neighboring electrodes may cause activity patterns to merge together. Furthermore, microstimulation is a relatively crude way of activating neural tissue, causing a large synchronous activation of all neural tissue in the vicinity of the electrode which is followed by a strong and long-lasting rebound inhibition of activity. This is very different to the activity produced by natural visual input, which causes complex spatial patterns of excitation and inhibition. Optogenetic approaches (as described below) would address these problems as the spatial/cellular and temporal precision of the technique is very high, it is essentially only limited by how precisely light can be applied to the neural tissue. Furthermore, optogenetics can be used to both excite and inhibit activity, theoretically allowing complex patterns of activity to be imposed on the brain.

### **Optogenetics**

Optogenetics has rapidly become established as a key tool in modern neuroscience research. In this technique neurons are caused to express light-sensitive proteins known as opsins (Boyden et al., 2005). Opsins can comprise ion-channels, or transmembrane pumps, which allow the membrane potential of the cell to be manipulated by exposure to light. Different molecular variants of opsins allow either excitation or silencing of neural activity and a wide-range of opsins are now available which are sensitive to different wavelengths of light and allow activity changes on timescales ranging from a few milliseconds to several seconds. These properties of opsins make them ideal as a tool to selectively activate or inhibit neural circuits to investigate the normal functioning of these circuits, as well as imposing artificial activity patterns, which could be used to drive artificial vision.

The expression of opsins is mediated by the injection of viral vectors directly into cortex. These vectors have been modified to carry the gene encoding for the opsin protein while removing the genes necessary for replication of the virus. Once the viral vector infects the cells at the site of the injection, the genes encoding for the opsin protein are expressed and the cells become sensitive to light. The vector also typically carries a gene encoding for a fluorescent marker, allowing identification of the neurons that are expressing the vector construct. Cell type specificity can be achieved by placing the opsin/marker genes behind a cell-type specific promoter. For example, by using the CaM kinase II promoter the opsin gene will only be expressed in excitatory neurons in which this promoter is active.

### **Artificial Vision and Optogenetics**

The use of optogenetics as a tool to create artificial visual percepts is still in its infancy and there are a number of technical and theoretical hurdles that need to be overcome if it is to replace, or be used as an adjunct to, a microstimulation-based prosthesis. Some of these hurdles reflect our lack of knowledge about how neural activity results in visual perception. We do not know which forms of activity result in perception and which do not. What is the critical factor? Is it the involvement of particular neurons, particular visual areas, connection types, activity patterns, strength of activity or some combination of these factors? The use of optogenetics presents an opportunity to move beyond correlative research and causally investigate the role of different neural activities in the creation of a visual percept. Other hurdles are technical, for example, can opsins be expressed over a large enough area to create useful percepts? Can excitation and inhibition be triggered at the same time using different wavelengths of light? Can light be applied in a sufficiently spatially specific manner? In this project we will carry out fundamental



research which will begin to answer many of these theoretical and technical challenges. The experiments described here will provide insight into whether optogenetic approaches to producing artificial vision are feasible as an alternative to microstimulation based prosthesis. This research is still at an early stage but in principle, in the future it may be possible to develop an optogenetics-based prosthesis to treat human patients as viral vector systems, such as AAV and lentiviral vectors, have already been used with success in gene therapy studies in human patients (Gonçalves, 2005; Kantor et al., 2014). The high safety level of AAV makes it an attractive candidate for such a prosthesis, although future studies beyond the scope of this license with lentiviral vectors cannot be ruled out as this virus provides more stable expression of the transgene.

### **Choice of the macaque monkey as experimental model**

Much of the developmental work of optogenetics has been carried out in mice. The availability of transgenic models in which opsins are expressed in particular neural sub-types allows very sophisticated probing of neural circuitry. The mouse visual system is superficially similar to that of humans; their cortical visual system contains a primary visual cortex (V1), which is surrounded by higher-level visual areas (although these are poorly understood in mice). Cells in mouse V1 are, like in humans, tuned for simple visual properties, such as the location and orientation of a contour. Unfortunately, there are also some key differences between mouse and human vision, which limit the usefulness of the mouse model in the development of visual prostheses. In mice, the retinas are very small and individual cells respond to much larger regions of space than those in primates. For example, a typical cell in primate V1 responds to light from one visual degree of space (the size of your thumb-nail at arm's length) whereas a mouse V1 cell responds to light from about 20 visual degrees (about the size of a football at arm's length). The spatial resolution of the rodent visual system is therefore, compared to the primate system, relatively poor. Furthermore, the primate retina contains a region of enhanced resolution, known as the fovea, which is used for all our detailed day-time vision. Much of the primate visual system is dedicated to moving the eyes around so that the fovea is pointing at behaviorally relevant parts of the visual scene, and the mechanisms of visual attention are closely linked to this function. In rodents there is no fovea and the retina is broadly speaking universally sensitive, there is therefore no requirement to move the eyes to 'foveate' objects and it is unclear to which degree rodents possess visuospatial attention. Mouse visual cortex is also extremely small, mouse V1 is only 6mm<sup>2</sup>, whereas the primary visual cortex of a macaque monkey is 1200mm<sup>2</sup>, much more similar to a human. This means that findings about how activity patterns spread through cortex will not translate well from mouse to humans, whereas the situation in macaques is much more comparable to that in humans. It is also not possible to use non-primate mammals with larger brains such as pigs or cats as these animals cannot be trained to perform the complex behavioral tasks necessary to assess the effect of optogenetic manipulations on perception (see below).

In our lab we work with both mice and monkeys and use the most appropriate model to answer a given question. If the question involves a fundamental visual process that is present in mice, monkeys and humans then we investigate this process in mice. If the process is not present, or fundamentally different, in mice then we use the macaque monkey. For the experiments described in this proposal we will carry out some of the work in mice – these experiments have already been described in CCD license AVD10.2.g and are ongoing. However, a number of critical experiments to translate our results to humans are not possible in mice and for these experiments work in monkeys is essential. In this application we describe these experiments.

### **Aims and outline of the project**

#### *Technical aspects*

The first key issue is to investigate the link between optogenetic activation/inhibition of cortex and phosphene perception. It is currently unclear whether optogenetic stimulation is able to modulate the activity of enough neurons to produce phosphene perception. The larger size of the monkey brain relative to the mouse brain means that more neural tissue has to be activated to produce overt effects. For example, in monkeys, optogenetic stimulation of the motor cortex does not produce overt movements (Diester et al., 2011; Han et al., 2009) but may bias ongoing movements (Cavanaugh et al., 2012; Gerits et al., 2012; Ohayon et al., 2013). However, optogenetic stimulation of somatosensory cortex in monkey does produce detectible sensations (May et al., 2014) and in visual cortex of monkeys, it has been shown that optogenetic stimulation can lead to phosphene perception (Jazayeri et al., 2012). Yet the parameters required to reliably produce phosphenes and the visual appearance of these phosphenes have so far not been systematically investigated. We will move beyond this study by investigating how reliably phosphenes can be produced using optogenetic stimulation of visual cortex using larger injections of more modern opsins. One possibility is to use a 'red-shifted' opsin which is sensitive to longer-



wavelengths of light than the opsins used in previous studies. Red light penetrates deeper into cortex than blue light allowing activation of the entire cortical column improving the chances of generating phosphenes. In all the experiments described here we will monitor the effect of the applied light on neural activity using a laminar electrode. These electrodes have multiple contacts that allow us to record neural activity across all layers simultaneously.

One of the major technical challenges in producing an optogenetics-based visual prosthesis is how to apply light to activate neurons in a spatially specific and safe manner. Traditional approaches use so-called optrodes, composed of an electrode combined with an optic fiber, to produce a very focal source of light that does not spread beyond a few millimeters within the monkey brain. In the studies described here we will implant a recording chamber (Figure 1A, Figure 3 in Appendix 3.4.4.1) with a transparent artificial dura allowing light to be shone directly onto the surface of the brain (Figure 1B) 10.1.c

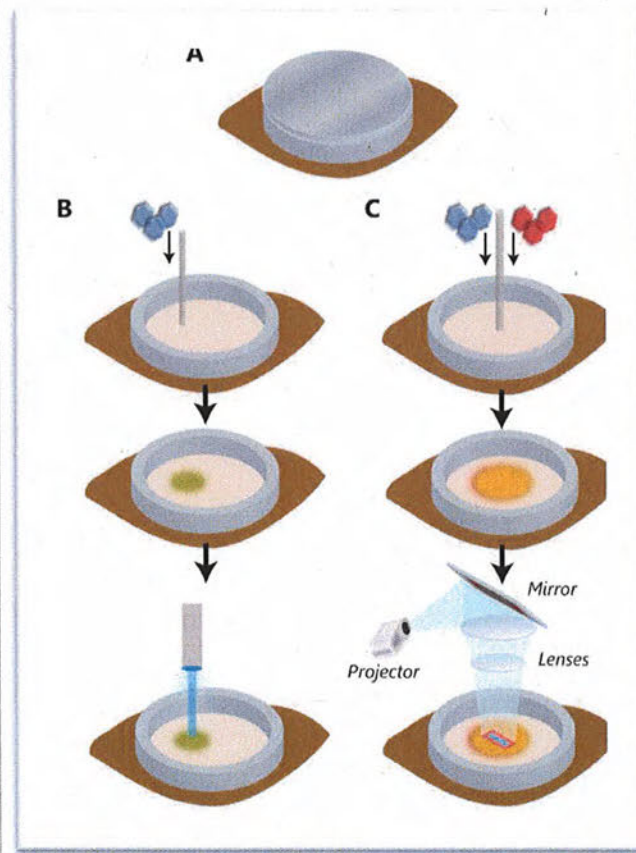
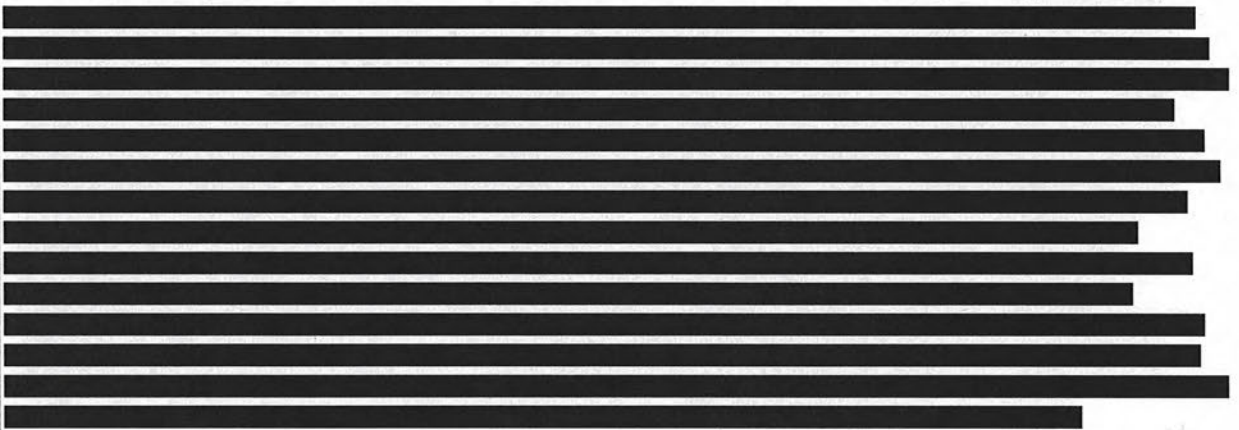


Figure 1. Optogenetic approaches in primates. A) A recording chamber and artificial dura is implanted over visual cortex. The recording chamber is sealed in between recording sessions. B) A viral vector encoding for an excitatory opsin is injected into cortex. 4 weeks later the expression of the opsin can be visualized by the tagged fluorescent marker. The patch of cortex expressing the opsin can then be excited by targeting it with a laser/LED light source. C) A different approach in which a mixture of an excitatory opsin (sensitive to blue light) and an inhibitory opsin (sensitive to red light) are injected simultaneously. After 4 weeks a patch of mixed expression is visible. A spatial pattern of light can then be projected onto the surface of the brain via a projector/lens system remote from the animal. Due to the different wavelength sensitivities of the opsins the blue light will cause excitation and the red light will cause inhibition. In this way a very spatially specific pattern of neural activity can be created.



### *Temporal aspects of optogenetics*

The use of optogenetics also opens up the possibility of studying the contribution of different temporal components of neural activity to perception. Visually driven activity in the primary visual cortex proceeds through two phases. Around 50ms after the onset of a visual stimulus there is a strong wave of spiking activity which propagates the visual input through the layers of V1 and onto higher visual areas. During this phase the cells of V1 respond to simple features (e.g. the orientation of a line) presented to a very specific part of the retina known as the receptive field of the cell. At around 100ms after stimulus onset the cells receive feedback from higher visual areas. These feedback signals bring global contextual information back to V1 and the activity of the cells begins to be modulated by high-level factors such as attention, behavioral relevance and reward. Importantly, activity in this later stage appears to correspond more closely to the percept of the animal than activity during the initial response. This has led some to propose that the late response in V1, and more generally feedback to V1, is essential for visual perception (10.2.e en 10.2.g). Using the excellent time-resolution of optogenetics we can test which aspects of temporal processing are necessary for different aspects of visual perception. We are actively pursuing this question in mice, testing whether suppression of the late response in V1 disrupts simple visual percepts, like the ability to detect an oriented line. However, it is likely that suppression of the late response in V1 affects a range of visual abilities such as the ability to encode and remember the location of a visually presented object or the ability to segregate an object from its background. To test these more advanced percepts we need to use tasks that are too complex to be learnt by mice (e.g. the delayed match to position test) and we therefore turn to the macaque visual system. The outcome of these experiments are important for the design of the best patterns of stimulation for the prosthesis as optogenetically-mediated control of the late phase of the response in V1 would offer the extremely exciting possibility to move beyond the creation of simple phosphene percepts and to create complex percepts that resemble more closely natural visual perception.

An additional approach to creating complex percepts would be to modulate the activity of neurons in higher visual areas. In particular, we will focus on area V4, which is thought to be an intermediate area in the pathway for object recognition and the source of many feedback projections to earlier visual areas (Roe et al., 2012). It is also thought to be a key area where visual attention interfaces with low-level visual representations. Neurons in V4 are tuned for more complex shapes and objects and activation of these neurons may help us to move beyond artificial percepts composed of spots of lights to a more natural perception of surfaces and edges. We will investigate the perceptual and neural consequences of activating/silencing this region using optogenetic tools. Will silencing activity in this areas remove feedback-related activity in V1 and what consequences does this have for the perception of the animal? Will the activation of V4 impart more complex percepts, which could be used to increase the level of sophistication of the visual prosthesis?

- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–8.
- Cavanaugh, J., Monosov, I.E., McAlonan, K., Berman, R., Smith, M.K., Cao, V., Wang, K.H., Boyden, E.S., Wurtz, R.H., 2012. Optogenetic Inactivation Modifies Monkey Visuomotor Behavior. *Neuron* 76, 901–7.
- Diester, I., Kaufman, M.T., Mogri, M., Pashaie, R., Goo, W., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Shenoy, K. V., 2011. An optogenetic toolbox designed for primates. *Nat. Neurosci.* 14, 387–397.
- Gerits, A., Farivar, R., Rosen, B.R., Wald, L.L., Boyden, E.S., Vanduffel, W., 2012. Optogenetically induced behavioral and functional network changes in primates. *Curr. Biol.* 22, 1722–1726.
- Gerits, A., Vanduffel, W., 2013. Optogenetics in primates: A shining future? *Trends Genet.* 29, 403–411.
- Gonçalves, M. a F. V., 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 337, 43.
- Han, X., Chow, B.Y., Zhou, H., Klapoetke, N.C., Chuong, A., Rajimehr, R., Yang, A., Baratta, M. V., Winkle, J., Desimone, R., Boyden, E.S., 2011. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex. *Front. Syst. Neurosci.* 5, 18.
- Han, X., Qian, X., Bernstein, J.G., Zhou, H.-H., Franzesi, G.T., Stern, P., Bronson, R.T., Graybiel, A.M., Desimone, R., Boyden, E.S., 2009. Millisecond-timescale optical control of neural dynamics in the

nonhuman primate brain. *Neuron* 62, 191–198.

Jazayeri, M., Lindbloom-Brown, Z., Horwitz, G.D., 2012. Saccadic eye movements evoked by optogenetic activation of primate V1. *Nat. Neurosci.* 15, 1368–1370.

Kantor, B., McCown, T., Leone, P., Gray, S.J., 2014. Clinical applications involving CNS gene transfer. *Adv. Genet.* 87, 71–124.

10.2.e en 10.2.g

May, T., Ozden, I., Brush, B., Borton, D., Wagner, F., Agha, N., Sheinberg, D.L., Nurmikko, A. V., 2014. Detection of Optogenetic Stimulation in Somatosensory Cortex by Non-Human Primates - Towards Artificial Tactile Sensation. *PLoS One* 9, e114529.

Ohayon, S., Grimaldi, P., Schweers, N., Tsao, D.Y., 2013. Saccade modulation by optical and electrical stimulation in the macaque frontal eye field. *J. Neurosci.* 33, 16684–97.

Roe, A.W., Chelazzi, L., Connor, C.E., Conway, B.R., Fujita, I., Gallant, J.L., Lu, H., Vanduffel, W., 2012. Toward a Unified Theory of Visual Area V4. *Neuron* 74, 12–29.

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

#### **Aim of the project**

The aim of this study is to investigate the plausibility of using optogenetic tools to create a visual prosthesis in macaque monkeys and to gain more knowledge about the fundamental neural mechanisms of visual perception in the process.

We can subdivide this main aim into four sub-aims:

#1) Can we induce phosphene percepts using optogenetic activation of V1?

*We will express excitatory opsins in the primary visual cortex of macaque monkeys. By activating the opsins using focally applied light we will test whether this results in the perception of a phosphene. The effect of the light on neural activity across the layers of cortex will be monitored with a laminar electrode. If this is successful we will proceed to sub-aim #2.*

#2) Can we impose activity patterns on the surface of V1 and can these patterns be interpreted as visual percepts?

*In this sub-aim we will test whether optogenetic techniques can be used to create the perception of simple shapes. We will express a combination of excitatory and inhibitory opsins in the primary visual cortex allowing us to shape spatial patterns of cortical activity into simple forms that can be read-out by the monkey.*

#3) What is the role of sustained activity in the primary visual cortex in generating a visual percept?

*We will use inhibitory opsins to silence activity in primary visual cortex at different time-points relative to a visually presented stimulus. We will causally determine the importance of different temporal phases of the neural response in generating the visual percept. The effect of the light on neural activity across the layers of cortex will be monitored with a laminar electrode.*

Sub-aims #1-3 will be carried out in the same two animals.

#4) What is the role of higher visual areas and the feedback they send to V1 in generating a visual percept?

*We will silence neural activity in a higher visual area, such as V4, at different time-points relative to a visually presented stimulus to determine the contribution of higher visual areas to neural activity in the primary visual cortex and the perception of the animal. We will activate neurons in this area and have the monkeys report their percept. The effect of the light on neural activity across the layers of cortex will*



*be monitored with a laminar electrode. Sub-aim #4 will be carried out in a different set of two animals as a different visual area needs to be targeted.*

Sub-aims #3 and #4 are not dependent on the ability to produce phosphenes and can still proceed if sub-aim #1 is unsuccessful.

#### **Achievability of the objective**

It is already clear from work from other labs that optogenetic tools can be applied safely and successfully in the macaque monkey and that the neural effects are comparable to those in the mouse (Diester et al., 2011; Gerits and Vanduffel, 2013; Han et al., 2011, 2009; Jazayeri et al., 2012). Our lab has already built up a great deal of experience using optogenetics in mouse studies that we can apply to the macaque studies. Our mouse studies have included the development of techniques such as clear window implantations and the use of projectors to impose patterns of activity on the brain. Given the larger size of the monkey brain, these techniques should be easier to apply in monkeys.

We have a great deal of experience training macaques to perform complex visual tasks. On an existing DEC licence, we have already trained one monkey on the wide-range of visual tasks required to answer sub-aim #3 (see section 3.4.3). We now aim to use inhibitory and excitatory opsins that have been first tested in mice, to influence neuronal activity during these tasks. It is advantageous to first design and test the viral vectors in mice and only move to the monkeys once the function and safety of the vector have been assured. We will test each viral vector in mice as part of the experiments of our ongoing CCD license. We will first ensure that each vector causes expression of the opsin in mice, and that the opsin has the desired effect on neural activity in mouse visual cortex. We will also examine the expression of the opsin using histological techniques in mice to ensure that the vector expresses across all layers and does not cause cell damage. If the vector passes these tests, then it can be used in monkeys. We also collaborate with a lab in Belgium that develops and tests new viral vectors for use in macaque monkeys. This will ensure the optimal choice of vector is made for our research questions.

The lab is situated in an excellent research environment where the facilities that are required for this project are available. All GGO licenses are in place to allow for viral-vector injections in monkeys.

The lab has an outstanding track record with high impact publications (Nature, Science, Nature Neuroscience, Neuron, PNAS, etc.). The work is funded through an 10.2.g grant as well as other grants from 10.2.g and the 10.2.g that aims to develop of visual prosthesis for blind people.

### **3.3 Relevance**

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

#### **Scientific relevance**

The experiments described here will result in technical advances, such as the development of new viral vectors and miniaturized projection systems, which can be used by other scientists. The experiments described here will further our knowledge about the fundamental mechanisms of visual perception. The contribution of different forms of neural activity in different visual areas to perception is largely unknown as we have lacked the appropriate tools to interfere with this activity. The experiments described here will answer fundamental questions about the role of sustained visual processing, feedback projections and activity in higher visual areas in forming the visual percept.

#### **Social relevance**

The experiments described here will determine the plausibility of the use of optogenetics to design an advanced visual prosthesis. These experiments will provide the foundation for future work which may ultimately lead to a treatment for blindness. In the majority of cases of blindness, the eyes have been damaged and sight cannot be restored through the use of retinal prostheses. For these patients, directly altering brain activity is the most promising avenue to restoring their sight. An optogenetics based prosthesis could provide an alternative, or adjunct to, a microelectrode based prosthesis. It has the potential to offer better spatial and temporal resolution than a device based on microstimulation. Furthermore, this project will contribute greatly to our understanding of how the brain gives rise to visual perception. Our findings will be communicated to basic scientists, clinicians, clinical researchers, and the general public.

### 3.4 Research strategy

#### 3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

To address each of the sub-aims described in section 3.2 we will perform experiments in macaque monkeys. The general strategy is identical for each sub-aim. The monkeys will first be trained to perform a variety of different visual tasks which test different aspects of visual perception. They will be trained to quickly switch between these tasks. Each task will involve the visual presentation of a stimulus and will require a response from the animal in the form of an eye or hand movement. 10.1.c

The choice of opsin and task depends upon the sub-aim:

To answer sub-aim #1 we will use excitatory opsins and optically excite neurons to produce phosphene percepts and investigate the relationship between the stimulated area of the cortex, the intensity and temporal properties of the light and the quality of the phosphene percept that is produced. These experiments form an important first step towards the generation of future prostheses based on optogenetic techniques.

To answer sub-aim #2 we will use a mixture of inhibitory and excitatory opsins (with different wavelength sensitivities) and impose patterns of activity onto cortex (e.g. by projecting a particular image onto the surface of V1 with a beamer/lens system). We can test whether monkey's can 'read-out' spatially imposed patterns, this would be an important step to determine the spatial resolution that may be possible with an optogenetic-based prosthesis.

To answer sub-aim #3 we use inhibitory opsins and silence activity at various time-points relative to stimulus onset. We will determine the contribution of sustained activity in V1 to a variety of visual tasks.

Note that it is possible to answer sub-aims #1-3 in the same animals if a mixture of excitatory and inhibitory opsins is used. If the different opsins are sensitive to different wavelengths of light, then excitation or inhibition can be driven at different points in cortex by using different light sources.

To answer sub-aim #4 we will use inhibitory opsins delivered to higher visual areas such as area V4 and examine the effect of silencing either the higher areas themselves, or silencing their axonal projections in V1, on performance in different visual tasks. This will help us to understand the role that feedback connections from higher brain areas to lower brain areas play in visual perception. In addition, we will use excitatory opsins in the same area and activate neural tissue to examine the quality of the percept produced by stimulation of a higher visual area.

The overall strategy requires one type of animal procedure as outlined in section 3.4.2.

#### 3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.



**Optogenetic investigations of visual perception: AP 3.4.4.1**

A newly acquired animal follows a highly standardized training program which acclimatizes the monkey to the primate facility and takes the monkey up to the point where they can perform simple visual tasks in daily training sessions (See flow-chart in Figure 2). These initial stages have been carefully optimized and are often performed by the well-trained technicians and animal caretakers of the facility. This standardization ensures a very high success rate acclimatizing monkeys to the facility and the training routine. Monkeys are obtained from the national primate center or in exceptional cases from licensed importers if there are no appropriate animals available at the primate center. They are socially housed in our facility, typically in pairs.

After acclimatization to the new environment the monkeys are trained to move into a primate chair that allows them to be moved comfortably from their home-cage to the experimental set-up. Once the animal can sit quietly in the chair for periods of >1 hour the animal undergoes a surgery to implant a head-post. The head-post is a small rod attached to the skull of the animal and it is used to fixate the head of the monkey during training and later electrophysiological recordings. This is an essential step because we train the monkey to control its eye position and these measurements are only possible if the monkey's head is fixed.

After recovery from the head-post surgery, the animal is acclimatized to having his head fixated in the chair. Most monkeys adapt very quickly to this step. The monkey then begins daily training sessions in which he acquires juice rewards for performing simple eye-movement or hand-movement based tasks. Initially the tasks are very simple, such as directing his gaze ('fixating') on a large dot on a computer screen for a few hundred milliseconds. During this process, the animal will be placed on a controlled fluid uptake regime. Gradually the difficulty of the tasks is increased by making the dot smaller until the animal can fixate, then make guided eye-movements towards visual targets after the presentation of a 'go' cue. At this stage, the animal is ready to be trained on more complex perceptual tasks.

The monkeys will be trained on a battery of visual tasks which test different aspects of visual perception. These tasks range from very simple tasks such as the phosphene detection task, in which the monkeys have to make eye-movements to small spots of light, up to more complex tasks, such as the delayed match-to-sample task, in which the monkey must remember a visual stimulus and select the matching stimulus from a range of options after a delay. By training the monkey on several tasks we will be able to use the same animal to determine the effects of optogenetic excitation/inhibition on a variety of visual processes.

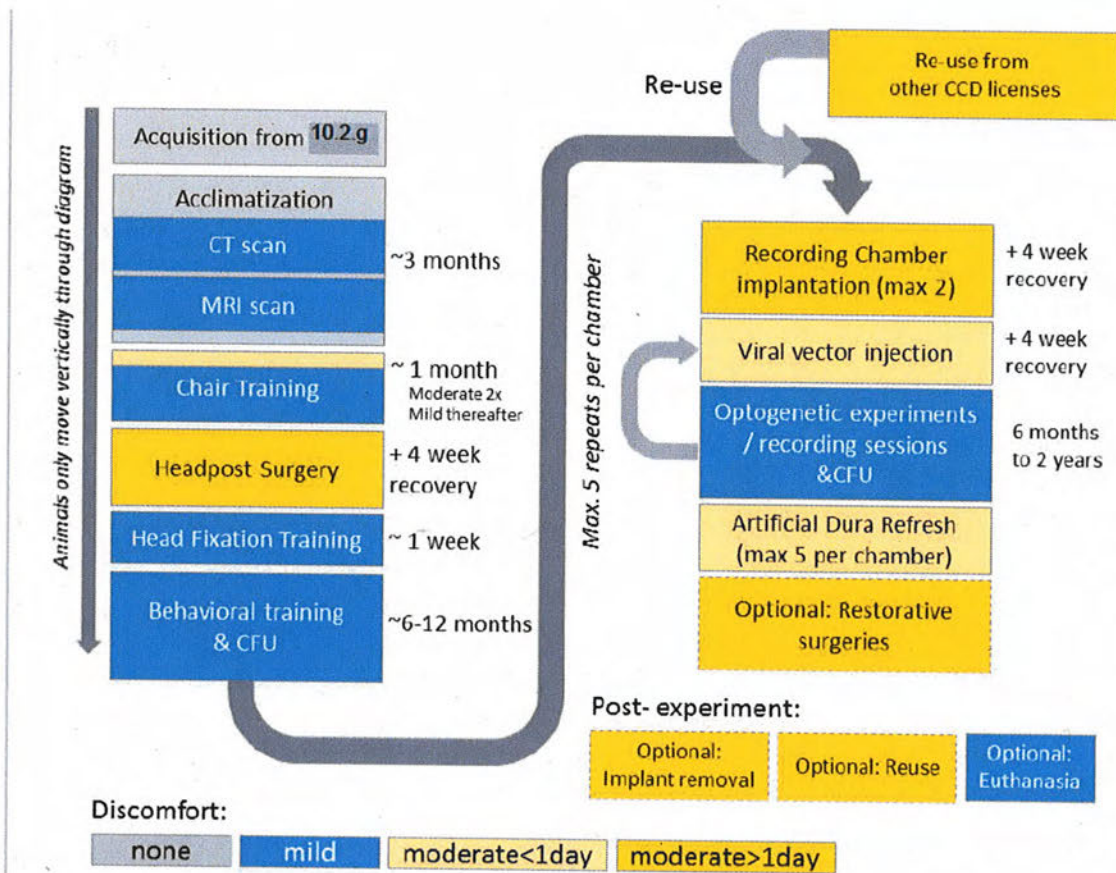


Figure 2 – A flow diagram outlining the steps of procedure 3.4.4.1. The order of the CT and MRI scan may be reversed. CFU refers to periods in which the fluid uptake of the animal is controlled. The procedures to the left are standard procedures in which the fluid uptake of the animal is controlled. The procedures to the right are specific to this license.

After reaching sufficient levels of performance on the tasks the monkey will undergo surgery to chronically implant a maximum of two recording chambers and artificial duras (See Figure 3 in Appendix 3.4.4.1). These are placed directly above brain areas of interest and a craniotomy is performed allowing access to the underlying brain tissue using traditional single electrodes or multi-contact laminar electrodes. Monkeys receive a maximum of two recording chambers over their lifetime. After the maximum has been reached, the animal may not receive any further implants. The recording chambers will be targeted to different visual areas depending on the sub-aim. For sub-aims #1-3 we will implant recording chambers over V1. For sub-aim #4 we will implant a recording chamber over V4.

The animals will be given at least 4 weeks to recover from the implantation surgery. After this period we will perform the viral vector injections. As a condition of our GGO license these must be performed at a DM-III safety level facility. As our institute does not possess such a facility the animals will be transported to a primate center in the Netherlands to perform the viral vector injections. Animals will always be transported and housed together with their cage-mate who will also be a monkey assigned to this license. The animals will be injected with a viral vector directly into cortex through the artificial dura. The vectors contain DNA encoding for particular opsin proteins and fluorescent markers. The animals will remain in the DM-III facility until a blood-test is negative for shedding of the vector. We estimate that this will take minimally 7 days and will almost certainly be shorter than 14 days. After the negative test the animals will be returned to their home cage in our primate facility. Following a period of approximately 4 weeks to allow expression of the opsins we will begin the optogenetic testing phase. In these experiments the animal performs one of the previously trained tasks while we excite/inhibit neural activity using short pulses of light. We also simultaneously record neural activity to monitor the success of the optogenetic manipulation using laminar electrodes moved into the brain through the artificial dura.



We will relate the neural activity profiles observed to the success of the animal on the tasks.

It may be necessary to repeat the viral vector injections at later time-points if the expression level of the vector at the initial site is not sufficient or the neural activity at the recording site becomes reduced. The procedure will be identical to that described above and the cycle of vector injection followed by optogenetic testing will be repeated maximally five times for each recording chamber. Please see the flow chart in Figure 2 for more details of the time-course of the experimental procedures. This means that an individual animal can be transported to 10.2.g for vector injection on 10 occasions. It is also possible that an animal may act as a cage-mate for a different animal on this protocol without receiving an injection. To keep the number of transportations to a minimum we will, where possible, inject both animals during the same session. In addition, we limit the total number of transportations to a maximum of 15.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The above experiments are all aimed at understanding the effects of optogenetic excitation/silencing of activity in early visual areas on visual perception. The results will provide the fundamental knowledge required to guide future research aimed at producing a visual prosthesis that functions through optogenetic principles. In addition, the results will provide direct evidence for the contribution of different forms of neural activity to the formation of a visual percept.

For all experiments, the injection of the viral vector is conditional upon successful application of the vector in mice. Each batch of viral vector will be tested in mice to ensure that the construct successfully expresses in mouse visual cortex and that the opsins have the desired effects on neural activity before proceeding to monkeys. These tests will be performed as part of our ongoing CCD license and do not form part of this application.

The experiments have been designed so that a number of different sub-aims can be addressed in the same set of two animals, thus reducing the total number of animals required. For example, sub-aims #1-3 can all be addressed in the same animal if we use a mixture of viral vectors encoding for both excitatory and inhibitory opsins. If these opsins are chosen to have different wavelength specificity we can cause either excitation, inhibition or a combination of the two in different spatial locations by using different light sources. In this way, the number of animals is kept to a minimum. Sub-aim #4 requires a new set of two animals as the opsins must be expressed in a different visual area.

The experiments of sub-aim #2 are dependent on successful completion of sub-aim #1, as it is unlikely that more complex shape percepts can be created if it is not possible to generate basic phosphenes. Sub-aims #3 and #4 do not depend on the outcome of sub-aim #1 as they are not reliant on phosphenes.

Some animals may be reused from other appendices or future CCD licenses. Re-use is an important aspect of macaque research, the animals are trained for many months and receive implants which can be functional for years. These animals can be retrained very quickly to perform other tasks and in many cases, experiments can be completed without the need for extra surgical procedures. This leads to an overall reduction in the number of animals used as each animal can take part in multiple research questions. The following table shows which animals can be reused in this protocol:

<b>Which implants does the animal possess?</b>	<b>Can the animal be reused?</b>
<b>Only a head-post</b>	Yes. The animal can be implanted with a maximum of two recording-chambers with artificial duras as part of this protocol.
<b>Head-post, plus recording chamber with artificial dura.</b>	Yes. No further surgeries required.
<b>Head-post, plus one implant (e.g. one set of electrode arrays, or one recording chamber without an artificial dura*).</b>	Yes. One surgery is required to implant a recording chamber with an artificial dura. The chamber will be implanted in the opposite



	hemisphere to the existing implant.
Head-post, plus two sets of implants (e.g. two sets of electrode arrays, two recording chambers without artificial duras)	No, the animal cannot be reused in this study.

*\*Recording chambers without artificial duras are not suitable for optogenetic studies and cannot be converted into suitable chambers.*

*The animals from this protocol can also be reused in other protocols under the condition that they will not receive more than two implants plus a head-post in their lifetime. The presence of the recording chamber and the light-sensitivity of the cortical tissue will not be an issue as the recording chamber will remain sealed and environmental light is not of sufficient power to activate the opsins.*

There is overlap between the animal studies described in this project and those in an ongoing DEC-approved protocol, before the revised national law came into effect. The work in the DEC protocol examines the function of sustained visual processing in the primary visual cortex. Using optogenetic inhibition we will silence late activity in the primary visual cortex while the monkey performs a battery of visual tasks including delayed matching tasks and simple discrimination and detection tasks. We will determine whether late-period activity in V1 is necessary for accurate performance on these tasks. The project requires the implantation of a recording chamber over V1 with an artificial dura. A viral vector encoding for an inhibitory opsin will be injected into V1. Recordings of neural activity during the optogenetic silencing will verify the effectiveness of the technique. Currently one monkey has been assigned to this protocol. The monkey has received a head-post and has been trained on several tasks already. The procedures carried out on this monkey have resulted in discomfort in accordance with the description of discomfort in the Appendix. The animal is in good health, is cooperative and social and is able to perform the tasks well. We will shortly implant the recording chamber and perform the viral vector injections.

After a license for this project has been obtained, all proposed experiments will formally be executed under this new license and we will write new study protocols to replace the current DEC protocol. The monkey which is currently assigned to the DEC protocol will be included in the number of animals requested for this project. Hence, we will transfer one animal from the ongoing DEC protocol to this license.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Optogenetic investigations of visual perception
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10.2.g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2.g
- | Serial number | Type of animal procedure                        |
|---------------|---|
| 3.4.4.1       | Optogenetic investigations of visual perception |

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The procedures described in this appendix concern the investigation of visual perception using optogenetic techniques.

Research questions:

- 1) Can we induce phosphene percepts using optogenetic activation of V1?
- 2) Can we impose activity patterns onto the surface of V1 and can these patterns be interpreted as visual percepts?
- 3) What is the role of sustained activity in the primary visual cortex in generating a visual percept?
- 4) What is the role of higher visual areas and the feedback they send to V1 in generating a visual percept?

The primary outcome parameters are:

i) The behaviour of the animal. The animal will be trained on a battery of different visual tasks. We will assess the effect of optogenetic manipulation on the outcome of these tasks.

ii) Neural activity. We will record neural activity using microelectrodes to assess the effectiveness of the optogenetic excitation and inhibition.

The monkeys will be acquired and acclimatized to the primate facility at the institute. They will undergo structural anatomical scans to guide the design of the surgical implants. It is critical for the success of these experiments that the monkey's head is held stationary as we need to be able to precisely measure the eye position of the animal, which is impossible if the head is moving. The animal will be implanted with a custom-designed head-post which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up.

The animals will then be placed on a controlled fluid uptake regime and trained on initial eye-movement related tasks. Once they have reached high levels of performance they will then be trained on a battery of visual tasks testing different elements of visual perception. Once trained, the animals will be implanted with a recording chamber which allows visualization of the brain through an artificial dura and easy access to the brain for microelectrodes and light. We will then use light sources to activate/inactivate the brain while the monkey performs one of the visual tasks while carrying out simultaneous neural recordings from the brain.

Animals may also be transferred to this protocol from other CCD approved licenses, but only if the animals have not experienced unforeseen serious discomfort. The animal will be implanted with a recording chamber with the condition that an individual animal can receive a maximum of two implants in their lifetime (e.g. 2 recording chambers) in addition to the head-post. See section 3.4.3 on the project proposal for more details.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

#### **Acquisition and housing**

Monkeys will be obtained from a licensed breeding facility. In all cases we will first try to obtain our animals from the national primate center. Only under exceptional circumstances (no monkeys available at the primate center) we will get them from a licenced importer. Monkeys will be housed in the primate facility at our institute. All animals are male and typically between 3-5 years of age when they arrive. This is the age at which young male monkeys typically leave their social group. We typically acquire two cage-mates together and these are then pair-housed for 3-4 weeks in a cage in isolation from the other monkeys (for quarantine reasons). When the results of viral and bacteriological tests are shown to be negative we can, if desired, pair these monkeys with established members of the group. This can be desirable to form stable pairings or larger groups (if social character of the animals allows it). Our facility contains large cages and the monkeys will have access to a floor-to-ceiling play cage, which allows them to climb and swing. The play cage also contains a 'look-out' platform where the monkeys can view other monkeys in the facility. The environment will be enriched with toys (e.g. boxes filled with nuts or sweets, which the monkeys can fiddle out) and access to natural daylight. A TV screen shall be running in front of the cages during the day. A logbook will be maintained individually for each of the monkeys, carefully monitoring their general appearance, their eating behaviour, weight, and the performance during the training sessions.

#### **Acclimatization**

*Discomfort: Mild or none*

The monkeys will be adapted to the animal housing facility and the staff. This includes but is not limited to an initial period in which the animal will be housed with a partner, will receive daily food treats from the staff, and will have access to toys in his cage and television. The total duration of the acclimatization period is approximately three months. Previously acquired monkeys in the facility have successfully undergone this period of adaptation and interact well with the staff and do not exhibit signs of stress due to their environment. During this period the monkey will receive a CT and MRI scan (see below). During one of these procedures the monkey will be fitted with a collar.

#### **CT scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

A CT scan is obtained to allow 3D models of the monkey's skull to be constructed. These are used to custom design surgical implants which perfectly fit the skull of the animal. The monkey is anesthetized in its home cage, and then transferred to the CT scanner. The scanning procedure lasts less than 5 minutes. The monkey is then returned to his home-cage, and he is allowed to recover from anaesthesia. The total duration of the procedure is approximately 30 minutes. This is typically the only CT scan required in the project. In the unlikely event that an implant comes loose, we may perform a further CT scan to assess the state of the underlying bone.

#### **MRI scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

Structural MRI scans are obtained to localize brain structures and plan surgical implants. The monkey is anesthetized in its home cage and then transferred to the MRI facility. The anatomical scan lasts



approximately 15-20 minutes, after which the monkey is returned to his home-cage, and allowed to recover.

### **Chair training**

*Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.*

The collar will be used to gently pull the monkey into the primate chair. Food and liquid rewards will be used in order to classically condition the monkey to enter the chair. Once learnt, the monkeys usually get into the primate chair voluntarily and rapidly. Once this behaviour is acquired, the animal will initially be rewarded with fruit or fruit juice for sitting quietly in the chair for short periods of time. The time spent in the chair will gradually be increased as the animal becomes ever more comfortable and will be adjusted according to the animal's behavioural reaction.

### **Surgery: Head-post implantation**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.*

All surgeries are performed in the purpose-built primate operation room within the primate facility of the institute. Specialist anaesthetic equipment is available and the surgeries are performed by trained staff. In order to head fix our monkeys during training; a head-post is attached to the skull. The head-post is custom-designed and 3D printed to fit the skull of the animal. After induction of anaesthesia, an incision is made in the skin, and the skin is gently pulled aside, exposing the area of the skull above the cortex. The head-post is attached and the skin is sutured closed. Analgesics are given during the surgery. The duration of the procedure is approximately 1-2 hours.

At the end of the surgery, the animal is monitored and kept warm while waking up. Additional analgesics are given during the recovery period. Following the surgery, training will be discontinued for at least four weeks so that the animal may recuperate. During this time the head-post will become solidly fixed to the animal's skull as the bone integrates with the implant.

### **Head-fixation training**

*Discomfort: Mild*

The animal will receive food and juice rewards for sitting quietly in the chair with their head fixated via the implanted head-post. The amount of time spent fixated in the chair will increase progressively and will be adapted according to the behavioral reaction of the individual animal. Once the animal quietly sits in the chair with his head fixed for a sufficient period of time (0.5 hours), the animal will begin training on the basic experimental tasks. The discomfort of this procedure is mild for the first one or two times that the animal is fixated, and close to zero from then on.

### **Behavioural training on basic tasks**

*Discomfort: Mild*

To motivate monkeys to perform their task, they are placed on a fluid control regime (described below). During training, the monkey is presented with sensory stimuli and responds with an eye movement and/or hand movement. We use positive reinforcement to train the animals, correct responses are followed by a fluid reward and the animals are allowed to work until satiated. The size of the reward is individually determined and is adapted throughout the training session to ensure that the monkeys remain motivated to work. No negative reinforcement is used, incorrect trials are typically followed by a lack of reward, and in some cases a small 'timeout' (5-10s) may be given. As the monkeys learn the paradigm and their performance increases, we gradually make the task more challenging. Task difficulty is adjusted to ensure that the monkeys are able to obtain their full fluid ration during the training session. During the training periods, animals are typically in the setup 5 days per week, 1-4 h per day (typical is 2h). On very rare occasions it may be necessary to train the animal during the weekend to complete a difficult training step, in these cases the animal will never be trained for more than 12 days continuously. Training on the initial tasks typically takes between 2-6 months depending on the monkey. An example of a training task is to have the monkey direct their eye to a very small region of a computer screen for 1s (known as 'fixation'). The difficulty of the task is slowly increased by gradually decreasing the size of the area that the animal must fixate upon while slowly increasing the duration of the fixation. At the end of the training period the animal is expected to be able to fixate in a 1° diameter window for at least 400ms and perform delayed saccade-tasks. A saccade is a very rapid eye-movement that monkeys (and humans) make approximately 3 times per second to direct the eyes to objects of interest. In a delayed-saccade task the animal must wait for a 'go' cue (e.g. the fixation dot changes colour)

before making his eye movement. Some animals are also trained to make hand-movements during the training period. The duration of this training period varies from 1 to 6 months depending on the aptitude of the monkey. In our experience, all monkeys are able to learn these tasks within 6 months.

### **Controlled fluid uptake**

*Discomfort: Mild*

To motivate the animals to work their access to fluid is controlled. The main reason why we use controlled fluid uptake is that we need to obtain a sufficiently large number of trials per session, for two reasons. First, we need reliable measures of the animals' perception which demands a large number of trials. Second, we obtain a larger number of trials to study the activity of neurons. The activity of neurons is inherently stochastic, i.e. the responses of a cell to repetitions of the same stimulus are variable, a stochasticity that is inherent to proper brain function. Controlled fluid access is by the far the most common method to motivate animals to perform cognitive tasks. We note that only healthy and cooperative monkeys that are at ease will perform these tasks in which they make eye or arm movements. Alternative methods have been explored as described by a workgroup for the British NC3R center (National Center for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010). These alternatives comprise 1) positive reinforcement with fruit juice, without controlled fluid uptake; 2) food-based reinforcement; 3) electrical stimulation of reward centers in the brain. Reinforcement with juice in the absence of controlled fluid uptake works well in the early stages of training when training sessions are short and tasks simple, but it is insufficient to motivate the animal to perform more difficult tasks or a larger number of trials. Food reinforcement with treats like raisins or peanuts is used in our lab to reward an animal for compliant behavior (for instance, for coming to the correct compartment of the cage to interact with a researcher). It can also be used as reinforcement for short and simple tasks at the start of training. However, animals satiate quickly when rewarded with food and chewing movements cause artifacts in our recordings, which makes this type of reinforcement unsuitable for sessions that require many trials and precise recording of neural activity. Electrical stimulation of the reward centers involves an extra surgery with the accompanying risks of complications and direct electrical stimulation of the basal ganglia may interact with the neural processes that are the main focus of this application.

Controlled fluid uptake is thus the only viable method available to obtain sufficient numbers of trials to be able to reliably measure behavior and neural activity. We implement controlled fluid uptake in a gradual fashion that adapts the level of fluid control to the behavior of each individual. We begin with positive reinforcement using fruit juice without any controlled fluid uptake. We only use fluid control regimes if the animal is not sufficiently motivated to perform the task with no fluid control. We gradually introduce the fluid control with the aim to have the animals drink as much fluid as possible and the fluid control is only made stronger if necessary. Nevertheless, in the majority of animals it is necessary to restrict access to fluid to some level to obtain enough trials on the complex behavioral tasks described in the application. The amount of fluid control is individually determined for each monkey and we always begin by training animals without any fluid control. Most animals require some level of restricted access to fluid to motivate to perform behavioural tasks, and almost all animals require restricted access to motivate them to work on complex tasks. Our aim is to allow the animal to drink fluid during performance on the behavioral task until they are satiated. This is achieved by:

- The difficulty of the task is adjusted on each day so that the animal is able to receive fluid at a high rate, motivating him to work for more trials, and drink more fluid in total.
- The rate of fluid delivery is slowly increased during a training session to ensure that the animals drinks throughout the session.
- If the training session has to be aborted, for example due to a technical fault, then the animal receives fluid equivalent to the average intake during a training session.
- We investigate the preferences of each animal for particular rewards e.g. apple juice, different types of fruit syrup, or water, and use a reward that is appealing to the animal

We take a number of measures to prevent dehydration:

- The monkeys always receive a minimum of 100ml of fluid each day. If this amount is not reached during the training session, it is supplemented.
- Averaged over a three-day period, the animals must receive a minimum of 35ml per kilogram metabolic weight per day, this number is based on recommendations by the British N3CR (National Center for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010) and the primate facility of UC Davis (2001). For example, a 10kg animal must receive a minimum of:  $10^{0.75} \times 35 = 197\text{ml}$  of fluid per day, averaged over the previous three days. If this average is not achieved, the animal is supplemented with fluid. This is a minimum amount and the animals typically



receive much more fluid than this.

- Fluid intake, both received during training and supplemented in the cage, is logged in an electronic system accessible by researchers, caretakers and inspectors.
- The animal is provided with fruit after the training session, the liquid content of the fruit is not counted towards the minimum amount.
- During breaks in the training schedule of more than one day (e.g. weekends) the monkey receives a full water bottle of at least 700ml, animals over 15kg receive an extra bottle. If the break is only one day, then the animal receives an amount of fluid equal to what it would typically receive during a training session.
- While the animal is under fluid control, the researchers and animal caretakers monitor its appearance and behaviour carefully every day, with checks by the animal caretakers during the weekend. We weigh the monkey before and after training and compare the weight to the average weight during the last week. The weight is also checked over longer intervals to prevent a slow loss of weight. We check the monkey for any signs of dehydration such as reduced skin tension, sunken eyes, either increased or reduced activity, dry faeces. If any of these welfare criteria is abnormal, the monkey is taken out of training and provided with ad libitum access to fluid until it has recovered. In that case, the Animal Welfare Body will be informed so that they can check the animal. These criteria (weight, fluid consumed per day) are logged in an electronic system for each monkey so that the history is accessible.
- The animal receives a non-working period once every 9 weeks (on average over a year). During this period the animal is not trained and receives a full bottle each day (>700ml).

The British NC3R center investigated in 2010 the use of controlled fluid regimes in brain research with macaque monkeys (Prescott et al., 2010). Their conclusion was that, when a controlled-fluid protocol is carefully applied and monitored, there are no negative consequences for the health of the animal. Follow-up research from the University of Newcastle (Gray et al., 2016) showed that controlled fluid uptake for 7 days per week did not lead to abnormal blood values or signs of dehydration. Another study (Hage et al., 2014) analyzed a broad range of behaviors over several months during fluid control and found no evidence for alterations in behavior, which indicates that the animals' wellbeing can be stably ensured during training sessions with a proper protocol. Indeed, from their general appearance, it is very difficult, if not impossible, to distinguish between monkeys under fluid control and monkeys with ad libitum access to water. Furthermore, the animals are seen regularly by a veterinarian to inspect their general condition, and we investigate measures of kidney function during the yearly checkups. We have never obtained indications of impaired kidney function. Hence, our own experience is in accordance with the literature, which indicates that a careful protocol of controlled fluid uptake is a safe and effective manner to motivate animals to perform the required cognitive tasks.

Gray et al., 2016. Physiological, Behavioral, and Scientific Impact of Different Fluid Control Protocols in the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). *eNeuro* 3(4).

Hage, S.R., Ott, T., Eiselt, A.-K., Jacob, S.N., Nieder, A., 2014. Ethograms indicate stable well-being during prolonged training phases in rhesus monkeys used in neurophysiological research. *Lab. Anim.* 48, 82–87.

Prescott M.J., Brown V.J., Flecknell P.A., Gaffan D, Garrod K, et al., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *J. Neurosci. Methods* 193, 167–88

University of California Davis, 2001. Policy statement: water restriction in rhesus behaviour studies. UC Davis Office of Environmental Health and Safety.

### **Behavioural training on complex tasks**

*Discomfort: Mild*

The animals will be trained on a battery of different complex visual tasks. The animals will be trained to switch between different tasks so that multiple tasks can be used on a single day. The tasks will include the following paradigms:

*Phosphene detection task:*

In this task the monkey is trained to make saccades towards small spots of light presented on a computer monitor. Catch trials (no light present) are also present on a percentage of trials. After



implantation of the recording chamber, the visual stimulation will be replaced on a percentage of trials by optogenetic stimulation. This tests whether the animal perceives a spot of light after optogenetic stimulation.

**Task battery:**

In addition, we will test the monkeys on a range of tasks, which include, but are not limited to: (1) Shape discrimination task. The monkey reports the shape of a stimulus with an eye-movement response. We will also test if optogenetic stimulation can be used to impose patterns in the visual cortex that are interpreted as shapes. (2) Memory and localization tasks. The animal sees a small spot of light. After a delay a set of choice options are presented and the animal should select the target which matched the location of the sample. The difficulty is varied by varying the spacing of the choice options. Another task in this category tests qualitative properties of phosphene perception, such as the size or color of the phosphene. The monkey is trained by presenting a sample, a small spot of light of a given size or color. After a delay a range of options are presented and the animal must select the option which was closest in appearance to the sample. (3) Tasks probing feedback from higher areas to lower areas (related to sub-aim #4). One example is a figure-ground segregation task, where the monkey is trained to make an eye-movement to the centre of a textured figure, presented on a textured background. Another example is a curve-tracing task, where monkeys mentally trace one of a number of curves. Based on the effects of optogenetic stimulation, other tasks may be added to the task set.

These tasks are complex and require long periods of in which the eyes have to be accurately directed towards a fixation point. The animals must monitor locations away from where the eyes are directed and memorize the perceptual qualities of phosphenes. Furthermore, the monkey must rapidly switch between these tasks on a single day. These properties make these tasks too complex to be performed by non-primate species.

**Surgery: Recording chamber implantation and craniotomy**

*Discomfort: Moderate for 2-3 days, becoming mild for 1 week.*

10.1.c

[Redacted text block]

10.2.g

[Redacted text line]

10.1.c

10.1.c

[Redacted text block]



10.1.c

### **Surgery: Injection/infusion of viral vector**

*Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)*

After recovery from the implantation surgery (minimally 2 weeks) the monkey will be anesthetized. Injections will either be made through the artificial dura using a glass pipette or through the native dura using an injection needle. Viral vector injections may be repeated at later time-points. If larger volumes of vector are required, then 'convection enhanced delivery' techniques will be used: A thin cannula will be inserted into the brain and an infusion pump will be used to slowly deliver the viral vector into the brain. The total number of viral vector injection/infusion sessions is limited to a maximum of 5 per recording chamber.

### **Transport and temporary housing at DM3 level.**

*Discomfort: Mild*

During injections/infusions of viral vectors, it is necessary to move the monkey to a DM3 biological safety level facility. To this aim the animals will be transported to a primate DM3 facility in the Netherlands. Animals will always be transported and housed together with their cage-mate (who will also be assigned to this license) to reduce social stress. The animals will first be trained to sit quietly in the specialized transportation cage for periods of 1-2 hours by associating the transport box with positive rewards such as fruit. They will consequently not be anesthetized during the transportation and experience only mild discomfort. The animals will be housed for a minimum of 7 days in the DM3 facility. After this period the animals may be returned to the home institute contingent upon a negative blood test (qPCR) for viral shedding in the blood circulation of both animals. Based on the rate of shedding of viral particles in macaques (Ciron et al., 2009; Nathwani et al., 2002), it is likely that the blood-test will be negative in the range of 7-14 days after the injection. We therefore anticipate that the animals will remain for 7-14 days in the DM3 facility after each injection/infusion.

To determine whether the opsin is successfully transfected it is possible to visualize the fluorescent marker protein that is linked to the opsin through the transparent dura. This is achieved by using a portable fluorescence microscope or goggle system. This procedure can be performed while the monkey is in the primate chair and does not cause any discomfort. It is highly likely that the vector we use will successfully transfect cells and drive expression of the opsin protein as we will use promoter sequences and serotypes that have been successfully used in primates in other labs. If it turns out that the first injection does not produce expression, despite a successful injection, we will change the serotype or promoter sequence in future injections.

It is likely that the expression of the opsins will remain in a useable range for periods of 4-8 months, and the total duration of the experiments with a given recording chamber may last for up to two years. We estimate therefore that a maximum of five injection/infusion procedures per recording chamber will be required giving a maximum of 10 injections in total. Monkeys may be transported to the primate center to act as cage-mates without being injected with virus. To keep the number of transportations to a minimum we will, where possible, inject both monkeys during a single session. We limit the total number of transportations to and from the primate center to 15 for an individual monkey. Recording sessions /

### **Optogenetic experiments**

*Discomfort: Mild*

The optogenetic stimulation and neural recording sessions follow an identical format to a behavioural training session, with the exception that the monkey is connected to the recording/stimulation

equipment. Optogenetic stimulation itself does not cause any extra discomfort. The animal's will perform the same tasks as outlined above. The duration of each session will be between 1-4 hours. The total duration of the recording sessions will be between 9 months to 2 years per chamber, although the implants remain useable after this time-period. To activate the opsin in the optogenetic experiments a light-source will be placed in close proximity to the transfected neural tissue. The light-source will be briefly illuminated (<1s) and the power of the light will be carefully monitored to ensure that no heat damage occurs. To monitor neural activity, thin laminar electrodes will be moved across the (artificial) dura into the brain using a micromanipulator. These electrodes contain multiple contacts which allow simultaneous recordings of neural activity at all cortical depths. At the end of each session the electrode will be removed and the chamber will be resealed with a tight-fitting lid and bone wax.

#### **Artificial Dura 'refresh' operation**

*Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)*

Tissue regrowth underneath the AD eventually causes the AD to become opaque. To restore the AD to its original condition we will remove the original AD, gently remove the underlying tissue and then implant a new AD. This procedure will be performed under light anaesthesia and lasts less than 1 hour. We estimate that this will be necessary once in a six-month period and will be performed maximally five times per chamber.

#### **Surgery: Restorative surgeries**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.*

In rare cases an implant (i.e. head-post, electrode array connector or recording chamber) may become loose. A repair surgery is then performed to prevent failure of the implant. The repair surgery is performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. The nature and duration of the repair surgery depends upon the type of implant and the extent of the problem. An individual monkey can undergo a maximum of two restorative surgeries per implant (including the head-post) during the course of these procedures. Repair surgery will always be performed in consultation with the Animal Welfare Body (IvD) and (if necessary) the veterinarian.

#### **Surgery: Implant removal**

*Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.*

Monkeys that have reached the end of the experiment and that will not be re-used in other experiments are sometimes kept at the institute because of social bonds that the monkeys have formed with other animals, or because they are particularly social animals that are useful for acclimatizing young animals. In these cases, the implants (recording chambers and head-post) are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia if possible. The skin is resutured over the location of the implants and in our experience the animals recover fully from the procedure.

#### **Annual health-check**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia).*

Once per year, each animal in our facility is checked by the veterinarian to assess their general health and appearance and to take blood samples for further testing. In this way the long-term health of the animals is closely monitored. The animal is lightly anesthetized during this procedure which takes 10-15 minutes per animal.

#### **Perfusion**

*Discomfort: Mild*

We aim to assess opsin expression in vivo using a portable fluorescent microscope or goggle system (see above). If this proves insufficient to assess the extent of the expression of the opsin proteins then it will be necessary to verify the expression using ex vivo histological methods. In this case the monkey will be euthanized at the end of the experiments. The animal will be given an overdose of barbiturates and cardially perfused with a fixative.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The statistics in our studies are performed across neurons and behavioural trials, and we perform



multiple recording sessions per animal meaning that we can acquire sufficient numbers of neurons with only two animals. Two is the absolute minimum number of animals that can be used to check for consistency across animals and is accepted as the norm in primate research. Although we have good experience with most of our monkeys, some individual circumstances may preclude a monkey from being used for a specific experiment (e.g. if he is not able to learn one of the behavioural tasks), or ambiguous results may require measurements in a third animal. In such cases, we will apply to the Animal Welfare Body (IvD) of the institute for permission to use a third monkey.

## **B. The animals**

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

### **Species used:**

We will use rhesus macaque monkeys (*Macaca mulatta*) in these experiments. All monkeys are obtained from a national primate center, or in exceptional circumstances (i.e. if no animals are available from a primate center) from a licensed importer. Monkeys are typically acquired aged 3-5 years. This project investigates processing in the brain using optogenetics and recording chambers. Due to the invasive nature of the procedure it is not possible to do the experiments in humans. The tasks that the animals will perform involve maintaining fixation while attending to other locations, as well as remembering the location of visual targets for several seconds and making eye movements to texture-defined objects. These tasks are too complex to be performed by rodents or larger mammals such as cats and pigs. In particular it is not possible to train non-primate species to fixate their eyes on one location of the visual field while requiring them to attend to a separate location. This requirement is essential for these experiments which require the animal to monitor the perceptual qualities of phosphenes presented away from the point of fixation. Rhesus monkeys have a neuroanatomy that is highly similar to that of humans and they can be trained to perform these more complex cognitive tasks. Given the similarity to human neuroanatomical organisation and the existing body of data that is available on psychophysical capacities and neurophysiological responses (Bough, 1970; Cowey et al., 1975; 10.2.e en 10.2.g ) the rhesus monkey is the appropriate model for the present study. This project also requires some preliminary testing of viral vector efficiency; this work will be done in mice under our existing CCD license. Vectors will only be used in monkeys if they are shown to be effective in mice.

### **Sex used:**

We exclusively use male monkeys in these studies. Our facility houses only male monkeys as males adapt better to living in paired social housing than females and there are no possible complications with breeding that would be present with female animals. The choice for males will not affect the results of the study as it is highly unlikely that there are differences between the sexes in how optogenetic excitation/inhibition influences visual perception. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.

### **Animal number:**

We expect that at least two animals are necessary in order to obtain reliable results for each experimental question considered. When comparable data is obtained from two individuals it can be assumed that the results are not attributable to individual differences. Previous studies have obtained reliable results from two animals, but given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. It could be possible that data from one animal must eventually be excluded from the analysis, contradictory results arise from the first two monkeys, or ethical considerations require the termination of one animal (humane endpoints). Such cases require the acquisition of data from a third animal. The acquisition of a third animal for a particular research question will be performed in consultation with the IvD of the institute. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 projects a third monkey was required (22% chance).

The experiments described here will be used to address the four different sub-aims outlined in the main body of the proposal. The experiments have been designed so that sub-aims #1-3 can be answered in the same animal(s) as these all involve optogenetic modulation of activity in V1. Sub-aim #4 requires different animals as the opsins must be targeted to a higher visual area. We therefore require two groups of animals. Given that we typically use two animals per group we envisage using 4 animals in the course of this proposal. The historical data above indicates a 22% chance per project of requiring a third animal, we therefore also request the possibility of adding one extra animal in the case of inconsistent results or problems with one of the animals. **We therefore require a maximum of 5 animals.** Note that we



have already included one monkey in an ongoing DEC protocol (described in the attached document: 'Overview of DEC protocol currently in progress'). This animal will be brought under this license and will count towards the total number of animals. We therefore require a potential maximum of 4 newly acquired animals. Note that, due to re-use, the actual number of animals used will be lower than this.

Bough, E.W. (1970). Stereoscopic vision in the macaque monkey: a behavioural demonstration. *Nature* 225, 42-44.

Ciron, C., Cressant, A., Roux, F., Raoul, S., Cherel, Y., Hantraye, P., Déglon, N., Schwartz, B., Barkats, M., Heard, J.-M., et al. (2009). Human  $\alpha$ -Iduronidase Gene Transfer Mediated by Adeno-Associated Virus Types 1, 2, and 5 in the Brain of Nonhuman Primates: Vector Diffusion and Biodistribution. *Hum. Gene Ther.* 20, 350-360.

Cowey, A., Parkinson, A.M., and Warnick, L. (1975). Global stereopsis in rhesus monkeys. *Q. J. Exp. Psychol.* 27, 93-109.

Nathwani, A.C., Davidoff, A.M., Hanawa, H., Hu, Y., Hoffer, F. a., Nikanorov, A., Slaughter, C., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Lozier, J.N., et al. (2002). Sustained high-level expression of human factor IX (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* 100, 1662-1669.

Prescott, M.J., Brown, V.J., Flecknell, P.A., Gaffan, D., Garrod, K., Lemon, R.N., Parker, A.J., Ryder, K., Schultz, W., Scott, L., et al. (2010). Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *J. Neurosci. Methods* 193, 167-188.

10.2.e en 10.2.g

Ruiz, O., Lustig, B.R., Nassi, J.J., Cetin, A., Reynolds, J.H., Albright, T.D., Callaway, E.M., Stoner, G.R., and Roe, A.W. (2013). Optogenetics through windows on the brain in the nonhuman primate. *J. Neurophysiol.* 110, 1455-1467.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

**Where possible.** The recording chambers implanted in these animals can provide functionally useful access to the brain for periods of several years. After the experiments of this procedure have been completed with these animals they can be retrained to perform other cognitive tasks without any further surgical interventions. In some cases, it may be possible to further implant an animal with an extra chamber in the opposite hemisphere. In these cases, the animals will be transferred to the relevant protocol. In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives a maximum of two recording chambers and has not undergone unforeseen serious discomfort. Re-use is preferable to the acquisition and training of a new animal as it leads to a reduction in the total number of animals. See Section 3.4.3 of the project proposal for more details of re-use.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes> Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

### D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.



**Replacement**

Our lab works with different animal models including mice and monkeys as well as carrying out work with human patients, healthy volunteers and neural network models. Much of the work that is required to answer our main research questions about visual perception can be carried out in mice and we have replaced several monkey experiments with work in mice. Indeed, all of the piloting work necessary for testing the viral vectors and establishing the basic effect of optogenetic manipulations on neural circuit activity will be performed in mice as part of our existing CCD license (these animals were included in the license and are not extra animals). We will also examine very basic visual tasks in mice, such as having the animal report the location of a visual stimulus (left or right) via a licking response and test which forms of V1 activity are necessary for accurate performance on this task. This work replaces a great deal of work that would otherwise have to be performed in primates. The 5 primates requested as part of this protocol cannot be replaced by mice for two main reasons: 1) The tasks required for this study are too complex to be performed by mice or other non-primate species. The tasks require animals that can fixate, shift their attention to other locations while maintaining fixation, hold complex visual percepts in memory for periods over several seconds, disambiguate complex objects and give reports via eye-movements. Only primates are able to perform tasks of this level of complexity. 2) The work described here is fundamental research that is necessary to determine whether it is feasible to produce an optogenetics-based neural prosthesis in humans. Information about the size of the cortical region that can be excited/inhibited and the spatial resolution of the light application are impossible to answer in mice because their visual cortex is so small. Macaque V1 is approximately 1200mm<sup>2</sup> in surface area whereas mouse V1 is approximately 6mm<sup>2</sup>, i.e. macaque V1 is about 200 times larger in area (additionally macaque cortex is 2mm thick, whereas mouse cortex is 1mm thick). Vector injections in mice can cover the entire primary visual cortex in one hemisphere, which is an unrealistic situation compared to primates where only a small region can be affected by a single injection. This makes it much easier to evoke behavioural effects in mice, as a proportionately larger fraction of neural tissue is affected. The results obtained from mice are unlikely to provide a realistic prediction of the situation that would be present in a human patient where V1 is even larger. Coupled with this, mouse vision has very low spatial resolution, so information about the effective spatial resolution of optogenetic induced percepts cannot be gathered in this animal. These differences between species mean that, while much of the groundwork can be done in mice, the final experiments testing the potential of optogenetics to produce complex visual percepts must be done in monkeys.

**Reduction**

The number of animals we want to use is the minimum number with which reliable results can be obtained, and no further reduction is possible. If possible, we will re-use the animals used in this procedure in further experiments leading to a reduction in the total number of animals used. Similarly, if possible we will reuse animal from other procedures/licenses for the studies described here. We estimate the total amount of re-use to be around one half, thus while we require 5 animals to answer our research questions, it is possible that up to 2-3 will come from other experiments, i.e. from other CCD approved licenses. Please see the included flow-chart for further details.

**Refinement**

All procedures (including housing) are refined to minimise discomfort for the animals as much as possible, using the latest knowledge and techniques in animal welfare. We take several measures to refine our experiments. First, we decrease the amount of stress by gradually introducing all aspects of the behavioural tasks, and careful conditioning of the monkeys to any novel aspects of our behavioural experiments. Second, we implement an elaborate set of measures (described above) to prevent adverse effects of the controlled fluid uptake. Third, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Fourth, our implants (such as head posts and recording chambers) are custom-designed to the anatomy of individual animals, and coated with biocompatible material that promotes bone growth, enhancing the integration of implants with the skull. Fifth, animals are housed socially in an enriched environment in order to keep them engaged, reduce the discomfort of living in a cage, and improve their cognitive abilities.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as needed. Post-surgical analgesics will be administered and animals will be kept on a warm blanket or under a warm lamp until they wake up. Food and fluids are placed in the home cage to facilitate easy

access to food and water. They will be allowed to recover for several weeks following surgery. During a recovery period of at least 7 days post-surgery, behaviour, wound area, and appearance will be monitored daily. Animals are monitored in an annual check-up by a veterinarian to ensure they are in good health.

After the recovery period, we constantly monitor the welfare of trained animals, assessing their appearance and behaviour every day. During periods of behavioural training the animals are weighed daily and all details concerning weight, appearance, fluid intake and any irregularities are recorded in an electronic database which can be viewed by researchers, caretakers and inspectors.

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

The proposed experiments are novel and an essential step to judge the feasibility of an optogenetics based neural prosthesis. The applicants are very familiar with the research literature on vision, optogenetics and visual prostheses and the present set of experiments are ground breaking and have not been performed previously. This research is not legally required.

### **Accommodation and care**

#### **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Monkeys will be housed solitarily for several days following an implantation surgery, to ensure full rest and recovery. The cage environment will be enriched by bedding material, swings, toys, and treats. We will monitor their weight and appearance on a daily basis.

After the virus injections the animals will be housed in a DM-3 level facility at a primate center. Animals will always be transferred and housed with their cage-mate to minimise social stress.

During training periods the fluid uptake of the animal will be controlled. The measures we take to reduce adverse effects of restricted fluid uptake have been described above.

#### **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

### **Classification of discomfort/humane endpoints**

#### **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.



Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

During surgery, anaesthesia and analgesia will be applied as described above. Also post-surgery analgesics will be administered.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

1. Infections: In rare cases there is a possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of microbial infection will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: (a) aberrant behaviour; (b) dehydration; (c) weight loss.
2. The occurrence of weight loss due to the controlled fluid uptake and the measures that we take to prevent dehydration have been described above.
3. Insufficient recovery after surgery: applicable if an animal shows permanent weight loss (more than 15%-20% of the weight immediately after surgery for more than 10 days). This occurs infrequently (<2%).
4. Loosening of an implant.
5. Brain swelling during operations.
6. Seizures. In very rare cases it may be possible an animal suffers from a seizure, this may be due to brain-swelling after an operation or a side-effect of an infection.
7. Sub-dural bleeding. During operations or electrode penetrations it can occur that a blood-vessel is damaged. Small bleeds typically cease within minutes with no ill effects. Very rarely the bleed may be larger leading to neurological symptoms. These typically disappear within a few days. In the case of persistent severe neurological symptoms, the animal is euthanized.

Explain why these effects may emerge.

Surgical implantation of cranial and brain implants is accompanied by risk of microbial infection, tissue rejection, or unwanted growth of granulation tissue that prevents the implant from integrating with the body. The causes of the other adverse effects are described above.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

1. We constantly monitor the animal's behaviour, liquid intake, wound area, and physiology. Surgeries are performed under sterile conditions and without any unnecessary delays to minimize the amount of time the animal spends under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication).
2. The measures to prevent dehydration due to controlled fluid uptake have been described above.
3. We monitor animals carefully after surgery. They are placed under heat-lamps during recovery and given post-operative analgesics. Food and water are freely available in the home-cage. The animals are temporarily housed alone after the surgery to allow proper recovery. All animals are checked once per year by the veterinarian to monitor their long-term health.
4. Over the years we have made several refinements to our cranial implants, such as head posts (described above in the section on refinement) and we continuously review and refine the design of our implants. Headposts and all cranial implants are now custom-designed for each monkey and 3D printed to ensure a good fit. This greatly reduces the chances of the implant becoming loose. In the unlikely event that a head post or array connector becomes loose or detached, the animal is closely inspected, and may undergo a CT scan to allow us to assess the condition of the bone. If an implant becomes loose/detached from the skull, we reattach the implant in a repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In rare cases (once in the past 10 years), the skull becomes infected, causing moderate discomfort. In these cases, the monkey is immediately euthanized under anaesthesia.

We minimize the occurrence of headpost failures by slowly adapting the monkey to being head-fixed in the set-up so that it is relaxed and does not exert strong forces on the headpost while fixed in the setup.

5. To combat the possibility of brain-swelling, we always give pre-, peri- and post-operative corticosteroids for operations in which the skull is opened and, if indicated, we give intravenous mannitol.

6. If the animal suffers a seizure, anti-seizure medication is given immediately and the underlying cause is treated, e.g. with high-dose corticosteroids or antibiotics. The veterinarian is informed.

7. All operations are performed as precisely as possible by trained staff.

#### **J. Humane endpoints**

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The monkey will be monitored for its general appearance and activity level. If a monkey has an appearance that gives cause for concern (e.g. signs of infection around the wound, weight loss, reduction in activity level) then we will notify the Animal Welfare Body and evaluate the animal together with the veterinarian of the institute. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 10-15% of their weight over a 2 day period then the veterinarian will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached.

If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within the time frame of the experiments.

#### **K. Classification of severity of procedures**

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

##### **Acclimatization**

Discomfort: Mild or none

##### **CT scanning**

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)

##### **MRI scanning**

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)

##### **Chair training**

Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.

The animal experiences some stress the first one or two times, but they very quickly learn to associate the chair with rewards and voluntarily enter the chair after this phase.

##### **Surgery: Head-post implantation**

Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.

##### **Head-fixation training**

Discomfort: Mild

Monkeys very quickly adapt to head-fixation.

##### **Behavioural training**



Discomfort: Mild

**Controlled fluid uptake**

Discomfort: Mild

These procedures are classified as mild, given that many measures are taken (described above) to ensure that the monkeys receive their daily fluid requirements.

**Surgery: Recording chamber implantation, craniotomy and artificial dura; maximum 2 in the lifetime of the animal**

Discomfort: Moderate for 2-3 days, becoming mild for 1 week.

**Surgery: Injection of viral vector; maximally 10 times in the lifetime of the animal**

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anesthesia)

**Transport and temporary housing at DM3 level; maximally 15 times**

Discomfort: Mild

**Recording sessions / Optogenetic experiments**

Discomfort: Mild

**AD 'refresh' operation; estimated frequency once per 6 months, max 10 times.**

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anesthesia)

**Surgery: Restorative surgeries; maximally 6 times**

Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.

Restorative surgeries cause considerably less discomfort than the original implantation surgery as there is no need to cut through the skin and muscle tissue, which have already been removed during the original implantation. Hence, the overall tissue damage is minimal and the animals recover rapidly. The surgery and recovery from surgery is classified as moderate discomfort (for 1-2 days), becoming mild (for 3-4 days). There is a maximum of two restorative surgeries per implant and a maximum of two restorative surgeries for the headpost.

**Surgery: Implant removal; maximally one time**

Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.

**Annual health check; maximally 5 times**

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)

**Perfusion**

Discomfort: Mild

**Cumulative discomfort**

The monkeys in this protocol will experience moderate discomfort for short periods following surgeries. All surgeries are performed under general anesthesia with appropriate analgesia. We use advanced anesthetic approaches in which an antagonist to the anesthetic agent is given at the end of the surgery. This leads to very fast recovery times compared to more traditional anesthetics meaning that the discomfort associated with these surgeries is at the lower end of moderate. We nevertheless ensure that the animals receive long recovery times of at least 4 weeks after implantation surgeries. The animals also experience mild discomfort for longer periods of time related to controlled fluid uptake and procedures associated with the recording sessions. We take several measures to maximise the amount of fluid received by the animals and we provide breaks in the controlled fluid uptake regime to keep this discomfort to a minimum. Given these considerations we estimate the cumulative discomfort to be moderate.

We base this estimation on a report of the Animal Procedures Committee who were instructed to address the question of cumulative discomfort in primate research by the UK government (Pickard, 2013). This report indicates that there is no evidence for an accumulation of discomfort above the discomfort of individual procedures. We take several measures to ensure that accumulated discomfort does not exceed the moderate level. We use long recovery times between surgeries to ensure that the animals have fully recovered before additional interventions take place. Animals are housed in a high standard social

environment with natural daylight and enrichment to facilitate natural behaviors like grooming, climbing, or foraging. Our controlled fluid protocol employs the mildest form of fluid control necessary to achieve the desired performance of the animal. The monkeys always receive water on each day as well as fruit (the liquid content of the fruit is not counted towards the total fluid amount) and the amount of fluid drunk by the animal is recorded in an electronic data-base. Previous studies of controlled fluid uptake by the N3CR center in the UK have found that there are no long-lasting effects of fluid control on the health of the animal (Prescott et al., 2010). Finally, we continuously monitor each animal's health and behavior in an electronic database, together with its weight and food and fluid intake. Although the behavior of animals that participate in these experiments is virtually indistinguishable from the behavior of animals that do not, we will also consult the opinion of an expert monkey ethologist on a regular basis to exclude psychological discomfort. If there is a threat that the future discomfort level of an individual animal might exceed moderate (for medical or psychological/ethologic reasons), the animal will be euthanized (humane endpoint) thereby excluding the possibility of severe discomfort. Given these considerations we estimate the cumulative level of discomfort experienced by the animals to be moderate. In the case of re-use, all discomfort experienced in a previous project is inherited by the current protocol and will be part of an animal's cumulative discomfort.

Pickard, J., 2013. Animal procedures committee of the UK, Review of the assessment of cumulative severity and lifetime experience in non-human primates used in neuroscience research, [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/261687/cs\\_nhp\\_review\\_FINAL\\_2013\\_corrected.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/261687/cs_nhp_review_FINAL_2013_corrected.pdf)

Prescott, M.J., Brown, V.J., Flecknell, P.A., Gaffan, D., Garrod, K., Lemon, R.N., Parker, A.J., Ryder, K., Schultz, W., Scott, L., Watson, J., Whitfield, L., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *J. Neurosci. Methods* 193, 167–188.

## End of experiment

### L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

**Sometimes.** If histological analysis needs to be performed to verify the extent of expression of the opsin, then the monkey will be euthanized at the end of the experiment, however we will assess opsin expression in vivo using a portable fluorescence microscope or goggle system. If this approach is successful, then it is likely that we will not need euthanize the animal. If euthanasia is required, then the animals will be given an overdose of barbiturates and will be cardially perfused with fixative.

In cases where anatomical information is not required, it may be possible for the animals to continue living as normal in their home cage at our primate facility or in a national primate facility. In these cases, the surgical implants are removed in a further operation if possible.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes



## Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.*

*Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.*

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD<sup>10.2.g</sup> 2017 3266
2. Titel van het project: [Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.](#)
3. Titel van de NTS: [Visuele waarneming door optogenetische stimulatie van de hersenschors.](#)
4. Type aanvraag:
  - [nieuwe aanvraag projectvergunning](#)
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: [10.2.g](#)
  - telefoonnummer contactpersoon: [10.2.e](#)
  - e-mailadres contactpersoon: [10.2.g](#)
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: [17-08-2017](#)
  - aanvraag compleet: [13-09-2017](#)
  - in vergadering besproken: [24-08-2017](#) en [21-09-2017](#)
  - anderszins behandeld: [niet van toepassing](#)
  - termijnonderbreking(en) van [28-08-2017](#) tot [13-09-2017](#)
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: [niet van toepassing](#)
  - aanpassing aanvraag: [finale herziene versie ontvangen op 13-09-2017](#)
  - advies aan CCD: [03-10-2017](#).
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.  
[De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat de aanvraag de instemming heeft van de \[10.2.g\]\(#\)](#)

*Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.*

8. Eventueel horen van aanvrager:

- Datum: 24-08-2017
- Plaats: 10.2.g
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7
- Aanwezige (namens) aanvrager: de verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vraag / vragen: de tijdens het horen van de aanvrager mondeling gestelde vragen zijn na de vergadering tevens schriftelijk aan de aanvrager gestuurd zie punt 9
- Verstrek(e) antwoord(en): zie punt vraag 9
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag wel; zie onder vraag 9.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum brief van de DEC: 28-08-2017.

*Gestelde vragen (samenvatting) 28-08-2017:*

1. *The DEC would like to read a clear motivation why the monkey is absolutely essential for this project. At present it is only motivated why rat/mice are not suitable but what about other larger mammals with a large V1 area (pigs – cats)?*
2. *It is unclear what the precise status is of the optogenetics research in relation to the aim of developing a prosthesis based on electrical stimulation.*
3. *What is the safety track record of the viral vectors? What is the safety track record of the viral vectors for use in therapies in humans? Would the transient expression be a future issue for use in visual prosthesis?*
4. *Viral vector will first be tested in mice. What exactly will you test?*
5. *Will you also permanently implant optic fibers for stimulation or will you push optic fibers through the AD during recording sessions?*
6. *Explain how the cage mates that will accompany the monkeys to 10.2.g will be selected. The DEC understands that the cage mates will be the same four (five) experimental animals on the project. The consequences for the maximum number of transport sessions / blood sampling should be indicated.*
7. *Give a more elaborate description of the first pilot for injecting the viral vectors. What exactly do you need to sort out?*
8. *The viral injection will transduce many cells including glial cells; the specific expression by neurons is fully dependent upon the promotor. Will expression by non-neuronal cells, due to leakiness of the promotors and the long-duration of the experiments (months), not interfere with the outcome of the experiment?*
9. *Only in the appendix it becomes apparent that you temporarily place a multi-laminar electrode in V1 during the actual sessions. This electrode serves to check which layers are responding to a light pulse. This aspect should be mentioned already in the strategy section of the Proposal*

- Datum antwoord: 13-09-2017
- Verstrek(e) antwoord(en): De aanvrager heeft in de herziene versie de aanvraag geïmplementeerd op bovenstaande punten en de gevraagde aanpassingen doorgevoerd.
- Tijdens de tweede bespreking van de aanvraag, op 21 september 2017, heeft de DEC geconcludeerd dat alle vragen en opmerkingen naar tevredenheid zijn beantwoord. De gevraagde aanvullende informatie is verwerkt in de finale versie van de aanvraag.



10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): **niet van toepassing**
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Advies expert

## B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.  
*Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.*  
**Het project is vergunningplichtig.**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.  
**Nieuwe aanvraag – Zie A4**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?  
**Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.  
**Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies.**  
**Alle DEC <sup>10.2.g</sup> leden zijn onafhankelijke externe leden.**

## C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).  
Deze aanvraag heeft als hoofddoelstelling: **Het bestuderen van de toepassingsmogelijkheden van optogenetische methoden voor het opwekken van visuele beelden en om met deze methoden meer inzichten te verkrijgen in de fundamentele neuronale mechanismen die resulteren in visuele perceptie onder normale omstandigheden.**  
Dit onderzoeksproject bestaat uit twee samenhangende onderdelen/subdoelen. Het eerste technische deel van het project zal een antwoord geven op de vraag of optogenetica een bruikbare techniek is door te onderzoeken of optogenetica kan worden gebruikt om een visueel percept op te wekken. Naar verwachting zal het gebruik van licht-gestuurde neuronale modulatie door toepassing van optogenetica aanzienlijk meer mogelijkheden bieden tot het opwekken van een percept dan bij gebruik van elektrische stimulatie. Met optogenetica is binnen het neurowetenschappelijke onderzoeksterrein ruime ervaring opgedaan (ook door de betrokken onderzoekers) maar toepassing in de hersenen van non-humane primaten staat nog in de kinderschoenen. Indien succesvol zal optogenetica worden ingezet in het fundamenteel wetenschappelijke deel van het project met als doel meer inzicht te krijgen in de fundamentele neuronale mechanismen die resulteren in visuele perceptie. De neuronale respons in de visuele cortex op visuele stimuli kent verschillende fasen; met optogenetische technieken zal worden getracht de functie en betekenis van deze fase te ontrafelen. Tezamen dragen beide delen bij aan de

inventarisatie van de mogelijkheden van optogenetica bij het ontwikkelen van een hersenschorsprothese voor blinden.

De DEC komt tot de conclusie dat de opbouw van de aanvraag overeen komt met voorbeeld 1 van de handreiking 'Invulling definitie project'. De proeven voor de beide subdoelen vertonen een logische tijds- en uitkomstafhankelijke opeenvolging en zijn verbonden door een go/no go moment. Beide subdoelen leiden tot het bereiken van het hoofddoel.

Uit de projectbeschrijving en bijlage is duidelijk welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welke procedures en welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Dit valt buiten de taakstelling van de DEC als beschreven in artikel 18a.2.b van de Wod. Naar deze specifieke informatie wordt in het aanvraagformulier en de bijbehorende toelichting niet gevraagd en de aanvrager heeft deze informatie dan ook niet verstrekt. Het is voor de DEC daarom niet mogelijk om op dit punt een onderbouwde uitspraak te doen. De DEC wil erop wijzen dat mocht dit in sommige omstandigheden wel het geval zijn dat de CCD in een procedure voorziet waarin de aanvrager inzage krijgt en verweer kan voeren.  
De biologischeveiligheidsfunctionaris (BVF) van het betrokken instituut heeft de IvD en DEC op eigen initiatief geïnformeerd dat de juiste GGO vergunningen met betrekking tot de veiligheid van medewerkers en het milieu zijn verkregen.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.  
De doelcategorie -fundamenteel onderzoek- sluit aan bij de hoofddoelstelling.



### **Belangen en waarden**

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het *doel* van het project is het bestuderen van de toepassingsmogelijkheden van optogenetische methoden om kunstmatig visuele beelden te kunnen opwekken en om meer inzichten te verkrijgen in de fundamentele neuronale mechanismen die resulteren in visuele perceptie onder normale omstandigheden. De verkregen fundamentele kennis zal uiteindelijk kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een hersenschorsprothese, al dan niet in combinatie met elektrische stimulatie, resulterend in een hoge kwaliteit van beeldvorming.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en inzicht gegeven in de stand van zaken in de wetenschap. Optogenetica is in andere proefdieren, ratten en muizen, een bewezen techniek om de activiteit van (sub-type) neuronen te kunnen moduleren. De betrokken virale vectoren kennen een veilige toepassing in de mens. Tevens is gepresenteerd wat de resultaten van het al verrichte werk van de onderzoeksgroep is op het terrein van visuele perceptie. De DEC is ervan overtuigd dat het directe doel van het project gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Dit alles is voor de DEC reden om te concluderen dat het voorgestelde onderzoek met de voorgestelde aanpak haalbaar is (directe doel) en dat de nieuwe kennis uiteindelijk zal bijdragen aan een verbetering van de revalidatie van blinden (indirect doel). Het project kent een belangrijke fundamenteel-wetenschappelijke component. De verkregen nieuwe kennis over de fundamentele neuronale mechanismen die resulteren in visuele perceptie hebben een grote wetenschappelijke waarde en zullen bijdragen aan een beter begrip van de werking van het brein en in het bijzonder hoe visuele perceptie en de activiteitspatronen van neurale activiteit in V1 en V4 samenhangen.

Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: De maximaal 5 resusapen. De integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door de gevangenschap zullen de dieren geen natuurlijk (groeps)gedrag kunnen ontplooiën zoals onder meer natuurlijke omstandigheden. De dieren zullen tijdelijk matig ongerief ondervinden ten gevolge van meerdere chirurgische ingrepen die ze in de loop van de proef zullen ondergaan. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. De dieren worden een aantal keren getransporteerd naar een andere huisvesting om de injectie met virale vectoren mogelijk te maken en om te conformeren aan de eisen in het kader van de wet op het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen (GGO).

Na afloop van de proef zullen de dieren in de meeste gevallen worden gedood. De bij de uitvoering van het project betrokken onderzoekers. Zij zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrière mogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Onderzoekers in veld van de neurobiologie en oogheelkunde. Dit onderzoek kent een fundamenteel-wetenschappelijke component en de te verwachte toename van de kennis over het ontwikkelen en toepassing van optogenetica zal met peers en het publiek worden gedeeld via publicaties. De wetenschappelijke resultaten zijn van algemeen belang om de werking van het brein beter te begrijpen en zullen bijdragen aan een beter begrip van de werking van het brein



en in het bijzonder hoe visuele perceptie en de activiteitspatronen van neurale activiteit in V1 en V4 samenhangen. De doelgroepen in de maatschappij. Dit onderzoek zal na voltooiing een beter inzicht geven in de (on)mogelijkheden van optogenetica in het proces om te komen tot een functionele hersenschorsprothese voor blinden. Dit zal er op termijn toe kunnen resulteren in een verbetering van kwaliteit van leven voor blinden.

5. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?  
Nee. Zoals gesteld onder C2 heeft de biologischeveiligheidsfunctionaris (BVF) van het betrokken instituut heeft de IvD en DEC op eigen initiatief geïnformeerd dat de juiste GGO vergunningen met betrekking tot de veiligheid van medewerkers en het milieu zijn verkregen.

### **Proefopzet en haalbaarheid**

6. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De voorstellen bouwen voort op de ruime kennis en ervaring die is verkregen door de uitvoering van technisch sterk vergelijkbare experimenten met resusapen binnen de groep. De benodigde kennis en ervaring m.b.t. het gebruik van virale vectoren is aanwezig binnen de groep door het gebruik van optogenetica op muizen.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.

7. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen van het project en bij recente wetenschappelijke inzichten. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen die bruikbaar zal zijn voor het ontwikkelen van een visuele hersenprothese. De keuze van het model en de keuze voor de resusaap als proefdier zijn gerechtvaardigd.

Tijdens de uitvoering van het project zullen de in de aanvraag beschreven kaders, inclusief de kaders van ongerief, nauwgezet door de IvD bewaakt worden. Dit is inclusief de dieren die op dit moment al worden gebruikt bij proeven die door de DEC onder de oude Wod zijn goedgekeurd. Deze proeven zullen door de IvD worden getoetst of ze inderdaad passen binnen het kader van deze aanvraag, de wetenschappelijke opzet wordt gezien en er wordt bekeken of de ongeriefsaspecten overeenkomen met het in de aanvraag geschatte ongerief.

### **Welzijn dieren**

8. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet



op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De doelstellingen van het project vallen binnen de voorwaarden die door de Wod aan het gebruik van niet-menselijke primaten worden verbonden. De keuze voor de resusaap als proefdier is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Andere diersoorten (honden, katten, varkens, muizen, ratten) die als "lager" worden gekenschetst dan de niet-humane primaten zijn niet geschikt door de hoge mate van complexiteit van de benodigde visuele gedragstaken. Ratten en muizen zijn niet geschikt omdat de visuele hersenschors te klein is. Mogelijk dat een aantal deelproject uit voeren zijn in proefdieren met een voldoende grote hersenschors maar dit zal, naar opvatting van de DEC, gepaard gaan met eveneens matig ongerief of zelfs een hogere mate van ongerief en met een toename van het aantal benodigde proefdieren. Het voor de proeven vereiste vermogen om langdurig te kunnen fixeren op een bepaald punt terwijl de aandacht op andere punten is gericht in het blikveld is uniek voor resusapen. De grote overeenkomsten tussen de hersenanatomie van mens en de resusaap zijn een belangrijk onderdeel om de waarde van optogenetische technieken in het kader van het ontwikkelen van een bruikbare hersenschorsprothese te kunnen vaststellen.

Er bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen.

De DEC komt tot de conclusie dat voor het bereiken van de doelstelling resusapen (*Macaca mulatta*) de inzet van resusapen noodzakelijk is.

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.  
De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De onderzoeksgroep doet veel moeite om de dieren sociaal te huisvesten en een verrijkte omgeving te bieden. Er is contact met een etholoog die adviezen geeft om een optimale selectie te maken voor de gepaarde huisvesting van de dieren en om de huisvestingcondities te optimaliseren. De wettelijke voorwaarden met betrekking tot het gebruik van GGO's in grote proefdieren vereisen dat de injecties met de virale vectoren worden uitgevoerd in een DM-III faciliteit. Het aanvragende instituut beschikt niet over een dergelijke faciliteit en daarom is een tijdelijke huisvesting elders noodzakelijk. De dieren blijven sociaal gehuisvest en worden gewend aan het verblijf in een transportkooi. De tijdelijke huisvesting op DM-III voldoet, volgens informatie van de IvD, aan de gestelde eisen.
10. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).



De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De onderzoekers hebben veel ervaring met dit onderzoek en zijn voortdurend op zoek naar verbeteringen in huisvesting, chirurgische methoden en proefopzet om het ongerief te verminderen.

Het cumulatieve ongerief is door de onderzoekers ingeschat als matig. De DEC onderkent dat de classificering van het cumulatieve ongerief voor dit type dierproeven niet eenvoudig is. De proeven lopen over meerdere jaren en de dieren ondergaan in die periode verschillende chirurgische ingrepen met telkens periodes van maximaal 3-4 dagen matig ongerief en daarnaast verschillende langere periodes waarin de aap gedragstaken moet uitvoeren onder milde druk van waterrestrictie (mild ongerief). Het lijkt aannemelijk dat niet-humane primaten, met hun hoge sociale intelligentie, sterk reageren en anticiperen op terugkerende momenten van ongerief die zich gedurende een lange periode in hun leven voordoen. Het is echter de vraag of het cumulatieve ongerief om die reden hoger ingeschat moet worden dan het matige ongerief van de afzonderlijke handelingen en dus bijvoorbeeld ingeschat zou moeten worden als ernstig. De DEC meent dat waarnemingen bij eerdere experimenten van vergelijkbare aard bij de aanvragende instelling geen feiten en omstandigheden hebben opgeleverd die aan die opvatting concrete steun geven. De DEC heeft hierover aanvullende informatie opgevraagd aan de IvD. De IvD heeft op basis van eigen ervaringen met de al lopende proeven aangegeven het ongerief te zien als cumulatief matig. De IvD is tevens van mening dat, juist door het langzaam gewennen van de dieren aan de huisvesting en de gedragstaken, er een situatie ontstaat waarbij de dieren coöperatief zijn en dat er geen sprake is van een grote psychische of fysieke belasting van de dieren tijdens de uitvoering van de gedragstaken. Recent gepubliceerde studies naar het cumulatief ongerief bij vergelijkbare experimenten bij andere instellingen geven steun aan de inschatting als matig van het cumulatief ongerief (Pickard, 2013 en Prescott 2010). Bij het gebruik van andere diersoorten is het onwaarschijnlijk dat een dergelijke situatie zal kunnen worden gecreëerd en bij het gebruik van bijvoorbeeld honden, katten of varkens zou er eerder sprake zijn van ernstig ongerief.

Alles overwegende komt de DEC tot het oordeel dat een inschatting "cumulatief matig ongerief" op zich een goede weergave is van het ongerief in het licht van wat er in de Wet op de dierproeven bedoeld wordt met de term "ongerief".

Dit alles neemt niet weg dat de DEC oog heeft voor het feit dat het zeer langdurige experimenten betreft, waarin de dieren gedurende langere periodes dagelijks worden ingezet in experimenten waarin zij met hun hoofd worden vastgezet, dorstgevoelens hebben en taken moeten verrichten waarmee zij vloeistof kunnen verdienen. Wellicht wennen zij hieraan en ervaren ze het – na die gewenning – niet als ongerief, maar feit is dat de dieren jarenlang in gevangenschap leven en hun leven volledig in het teken staat van deze experimenten. Het betreft dieren die zowel sociaal als psychologisch zeer complex zijn en dit stelt hoge eisen aan de omgeving en de sociale verbanden waarin de dieren leven. Er wordt weliswaar een reeks maatregelen genomen om de dieren een verrijkt leven te bieden maar dit is geen volwaardige vervanging voor een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. Het is echter lastig om te bepalen welke voor de dieren belangrijke natuurlijke gedragskenmerken ze worden ontzegd door de huisvesting en de experimenten en het is daarom moeilijk te bepalen in welke mate dit tot een aantasting van het welzijn en de integriteit van de dieren leidt.

In de aanvraag is er sprake van de mogelijkheid dat de dieren na afloop van de experimenten gaan deelnemen aan experimenten onder andere CCD vergunningen; de aanvragers noemen dit "re-use". Hieraan is de voorwaarde verbonden dat het dier, naast de headpost, nooit meer dan twee craniale implantaties zal krijgen en dat er zich geen (onvoorziene) omstandigheden hebben voorgedaan waarbij sprake was van ernstig ongerief.



In de aanvraag is er ook sprake van re-use vanuit experimenten in het kader van andere CCD vergunningen. Hiervoor zijn heldere voorwaarden gepresenteerd. Ook voor deze dieren geldt dat het dier nooit meer dan twee craniale implantaten zal krijgen en dat er zich geen (onvoorziene) omstandigheden hebben voorgedaan in de voorafgaande experimenten waarbij sprake was van ernstig ongerief.

Het voordeel van de geschetste praktijk van re-use is dat het totaal aantal dieren hierdoor zal verminderen. Het nadeel is dat het ongerief voor een individueel dier zal toenemen maar dat een extra periode van gewenning aan de faciliteit en trainingsprocedures wordt voorkomen. De DEC volgt de motivering van de aanvragers m.b.t. het gebruik van een dier voor vervolggexperimenten maar omdat het ongerief van het individuele dier groter wordt is het ook denkbaar dat het gebruik van meer dieren te prefereren is. De DEC heeft dit in een eerder advies als dilemma benoemd.

- 11.** Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door het leven in gevangenschap zullen de dieren zich niet kunnen ontplooiën zoals in een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. De dieren worden weliswaar paarsgewijs gehuisvest, dit is een belangrijke verbetering t.o.v. solitaire huisvesting, maar het stelt de resusapen niet in staat om een normale sociale groepsstructuur te vormen. Ook met de talrijke "verrijkingen" die de dieren worden verstrekt, kan niet volledig worden voldaan aan hun sociale en psychische behoeften. Prikkel en omstandigheden waaraan de dieren in natuurlijke omstandigheden voldoening of welzijn zouden ontleenen worden zoveel mogelijk nagebootst of vervangen door andere prikkels en omstandigheden waarvan men aanneemt dat die een vergelijkbaar effect zullen hebben. Feit blijft echter dat het om een kunstmatige omgeving gaat waarin men onvermijdelijk op beperkingen stuit. Er worden de dieren ervaringen die hen voldoening en plezier geven onthouden (zie ook C10). Ten behoeve van de experimenten worden diverse implantaten in en op het hoofd aangebracht. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. Na afloop van de proef, of na hergebruik, zullen de dieren merendeels worden gedood.
- 12.** Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De humane eindpunten zijn voor elk van de bijlagen dierproeven duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken; dit op basis van ervaring. De aanvrager zal gedurende de gehele uitvoering van de proef het welzijn nauwgezet monitoren. De DEC is daarom van mening dat de aanvrager, indien de dieren toch een humaan eindpunt bereiken, tijdig in kan grijpen om onnodig lijden te voorkomen.

### **3V's**

- 13.** Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. Hoewel de gebruikte virale vectoren veilig worden geacht voor gebruik in de mens zijn de voorgestelde proeven toch niet mogelijk in de mens gezien de risico's van intracraniale injecties, het herhaald inbrengen van



elektrodes, en de kans op infecties van het implantaat. Bovendien is het gebruik van optogenetische technieken in de mens nog niet op veiligheidsaspecten geëvalueerd. Het gebruik van niet-invasieve methodes bij de mens zal niet resulteren in het behalen van het gestelde doel.

De zeer grote overeenkomst van de anatomie van de betrokken hersengebieden tussen de mens en de resusaap maakt dat het gebruik van deze soort de beste kans biedt op het realiseren van de doelstelling.

De DEC is tot de conclusie gekomen dat voor het bereiken van de doelstelling apen (*Macaca mulatta*) de meest geschikte diersoort is.

- 14.** Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is geraamd en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De aanvrager verwacht dat voor de proef 5 dieren nodig zijn. Het aantal van 2 dieren per proef is gangbaar binnen in dit wetenschappelijke veld. Het is niet uit te sluiten dat er zich in de loop van het project omstandigheden voordien die de inzet van een extra dier noodzakelijk maken. De criteria voor het gebruik van een vijfde dier binnen het project zijn duidelijk beschreven in de aanvraag. De aanvrager heeft de DEC informatie verschaft over de kans is dat het gebruik van een extra dier noodzakelijk zal blijken te zijn. Op basis van eigen ervaring wordt die kans op 22% geschat. De DEC onderschrijft de verwachting dat er een redelijke kans is dat het uiteindelijke aantal dieren op vijf uitkomt.

De DEC concludeert dat het totaal aantal dieren op maximaal vijf dieren zal uitkomen. In het geval de noodzaak ontstaat om meer dan vijf dieren is een wijziging noodzakelijk.

Naar de mening van de DEC zijn de randvoorwaarden voldoende duidelijk beschreven om de IvD in staat te stellen de noodzaak van een vijfde dier te kunnen beoordelen. Door de gefaseerde aanpak van het project wordt optimaal gebruik gemaakt van de proefdieren. Het gebruik van dieren vanuit andere proeven verhoogt het ongerief voor het individuele dier maar het vermindert het totaal aantal benodigde dieren. De DEC heeft dit in een eerder advies als een dilemma signaleerd.

- 15.** Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De dieren worden geleidelijk blootgesteld aan nieuwe aspecten van de uitvoering van de gedragstaken. Een nauwgezette registratie van de hoeveelheid gedronken water vindt plaats om zo uitdroging en schade op de langere termijn te voorkomen. De virale vectoren zijn vooraf getest op functionaliteit en veiligheid. De chirurgische ingrepen worden door ervaren personeel uitgevoerd. De implantaten worden aangepast aan de individuele dieren zodat het de kans op complicaties wordt verminderd. De dieren blijven sociaal gehuisvest tijdens het verblijf buiten het Instituut. De verwachting is dat humane eindpunten, dus om redenen van lijden van het dier, zelden zullen worden bereikt.

- 16.** Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe.



### *Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Naar verwachting zullen de meeste dieren in proef na afloop worden gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt. Zie voor details onder C10 en C18.

- 17.** Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
De aanvrager gebruikt uitsluitend mannelijke dieren omdat mannelijke dieren zich makkelijker aanpassen aan de gepaarde huisvesting dan vrouwen. Het gebruik van beide geslachten beperkt de mogelijkheden om ideale duo's te vormen voor de huisvesting wat van groot belang is voor het welzijn van de dieren.
- 18.** Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Indien nodig in het kader van het onderzoek worden de dieren gedood om via histologische analyses inzicht te krijgen naar de exacte posities van de stimulatie elektrodes in het brein en naar de expressedistributie van de virale vectoren. Er wordt een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt volgens bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU (overdosis barbituraten gevolgd door cardiale perfusie met fixatief).

Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Wanneer er geen noodzaak is tot doden kan het dier ook gaan deelnemen aan experimenten onder andere CCD vergunningen ("re-use"; zie C10). In andere gevallen kan het dier blijvend worden gehuisvest binnen het Instituut. Dit betreft bijzonder sociale dieren die een rol spelen in het acclimatiseren aan de huisvesting van nieuwe dieren. Ook zal worden overwogen om de dieren in een primatenopvangcentrum te huisvesten. Zie het NCad advies over herplaatsing: <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing>). De DEC wijst erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing uiterst beperkt zijn, een extra chirurgische ingreep vereisen met matig ongerief als gevolg, en het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier (de DEC heeft al in een eerder advies een dilemma gesignaleerd m.b.t. de herplaatsing). De DEC adviseert dat voor wat betreft de besluitvorming rondom een eventuele herplaatsing wordt verwezen naar genoemd NCad document (i.h.b. pagina 42-45). In het kort; de *vergunninghouder* besluit, geadviseerd door de IvD.

### **NTS**

- 19.** Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?  
De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.



## D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).  
Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht over de toepassingsmogelijkheden van optogenetische methoden voor het opwekken van visuele beelden en om met deze methoden meer inzichten te verkrijgen in de fundamentele neuronale mechanismen die resulteren in visuele perceptie onder normale omstandigheden, het cumulatieve matige ongerief dat maximaal 5 resusapen wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).  
De volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5):  
Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: *maximaal matig nadeel*. Dit nadeel bestaat uit meerder periodes van matig ongerief ten gevolge van het uitvoeren van de proef en uit langere periodes van licht ongerief door de uitvoering van complexe visuele gedragstaken en transportsessies. De dieren zullen onder de gegeven huisvestingscondities, ondanks de uitgebreide reeks maatregelen om het welzijn te verbeteren, niet hun gehele repertoire aan natuurlijk groepsgedrag tot uiting kunnen brengen.  
  
Waarden/belangen van de onderzoekers: *veel voordeel*. Deze belangen bestaan voornamelijk uit het verbeteren van hun positie in het betrokken wetenschappelijke veld. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van relatief gering gewicht voor de ethische afweging.  
  
Waarden/belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de neurobiologie en de oogheelkunde: *veel voordeel*. Het voorgenomen project zal inzicht geven in de mogelijkheden van optogenetische methodes en meer inzicht verschaffen in de fundamentele neuronale mechanismen betrokken bij de visuele perceptie onder normale omstandigheden. De wetenschappelijke resultaten zijn van groot belang.  
  
Waarden/belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen, *andere wetenschapsgebieden*): *veel voordeel*. De verkregen fundamentele kennis zal op termijn kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een hersenschorsprothese, al dan niet in combinatie met elektrische stimulatie, resulterend in een hoge kwaliteit van beeldvorming. De dierexperimenten met resusapen zijn een essentiële stap om dergelijke protheses te kunnen verbeteren.
3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
De DEC is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende



overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:

- Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename de technische kennis m.b.t. het gebruik van optogenetische methodes en tevens tot een grotere fundamenteel wetenschappelijke kennis.
- De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en recente wetenschappelijke inzichten en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
- Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig resusapen te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar verwachting, beperkt blijft tot maximaal matig ongerief. Zie voor een uitgebreide motivatie m.b.t. het ongerief onderdeel C10.
- De DEC is er van overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis. Verschillende subsidiegevers steunen het project.
- De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, en tijdens de uitvoering van het project te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.
- De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik van maximaal vijf resusapen rechtvaardigt.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen voor maximaal 5 dieren.
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
  - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist x Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: Gegeven de informatie over de kans op de noodzaak van een vijfde aap is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een maximum van vijf dieren. In het geval de noodzaak ontstaat om meer vijf dieren te gebruiken is een wijziging noodzakelijk.
- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).  
Het advies is unaniem.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).  
De DEC heeft in een eerder advies een drietal dilemma's gesignaleerd: 1) het al dan niet toepassing van re-use, 2) de problematische inschatting van het niveau van cumulatief ongerief (zie onderdeel C10 van dit advies) en 3) de opvang na afloop van de proef versus doden van de dieren. Deze drie dilemma's zijn ook van toepassing binnen dit project maar worden hier niet herhaald.



**Van:** [Info-zbo](#)  
**Aan:** "secretariaat DFC"  
**Cc:** 10.2.e en 10.2.g 10.2.e  
**Onderwerp:** FW: OntvangstBevestiging 3266  
**Datum:** vrijdag 17 november 2017 09:13:14  
**Bijlagen:** [OntvangstBevestiging.pdf](#)

---

Goedemorgen,

Hierbij nogmaals de ontvangstbevestiging. Achter in de brief, laatste pagina is kunt u het factuur vinden. In een eerder mail heb ik de factuur apart opgestuurd.

Mvgr.  
10.2.e

-----Oorspronkelijk bericht-----

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 4 oktober 2017 9:45  
**Aan:** 10.2.g  
**CC:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** OntvangstBevestiging 3266

6

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Graag maken wij u erop attent dat vergunningen en andere besluiten van de Centrale Commissie Dierproeven met ingang van 1 september 2017 uitsluitend nog per e-mail zullen worden toegezonden. Dit geldt ook voor de ontvangstbevestigingen. De verzending per gewone post zal komen te vervallen.

Met vriendelijke groet,  
10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



Centrale Commissie Dierproeven

7

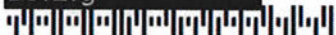
> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

10.2.g



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
10.2.g 20173266  
**Bijlagen**  
2

**Datum** 4 oktober 2017

**Betreft** Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte **10.2.e en 10.2.g**

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 oktober 2017. Het gaat om uw project "Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD<sup>10.2.g</sup> 20173266. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

#### **Wacht met de uitvoering van uw project**

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

#### **Factuur**

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.



**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

4 oktober 2017

**Aanvraagnummer:**

10.2.g 20173266

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
4 oktober 2017  
**Aanvraagnummer:**  
10.2.g 20173266

### Gegevens aanvrager

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10.2.g  
Naam instelling of organisatie: 10.2.g  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 10.2.e en 10.2.g  
KvK-nummer: 10.2.g  
Postbus: 10.2.g  
Postcode en plaats: 10.2.g  
IBAN: 10.2.g  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: 10.2.g

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 10.2.e en 10.2.g  
Functie: 10.2.e en 10.2.g  
Afdeling: 10.2.e en 10.2.g  
Telefoonnummer: 10.2.e en 10.2.g  
E-mailadres: 10.2.e en 10.2.g



**Datum:**  
4 oktober 2017  
**Aanvraagnummer**  
10.2.g 20173266

**Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker**

**Naam:** 10.2.e en 10.2.g  
**Functie:** 10.2.e en 10.2.g  
**Afdeling:** 10.2.e en 10.2.g  
**Telefoonnummer:** 10.2.e en 10.2.g  
**E-mailadres:** 10.2.e en 10.2.g

**Over uw aanvraag**

**Wat voor aanvraag doet u?**

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

**Geplande startdatum:** 1 november 2017  
**Geplande einddatum:** 30 oktober 2022  
**Titel project:** Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.  
**Titel niet-technische samenvatting:** Visuele waarneming door optogenetische stimulatie van de hersenschors.  
**Naam DEC:** 10.2.g  
**Postadres DEC:** 10.2.g  
**E-mailadres DEC:** 10.2.g

**Betaalgegevens**

**De leges bedragen:** € 935,-  
**De leges voldoet u:** na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

**Verplichte bijlagen:**

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

**Overige bijlagen:**

- DEC-advies

**Ondertekening**

**Naam:** 10.2.e en 10.2.g  
**Functie:** 10.2.e en 10.2.g  
**Plaats:** 10.2.g  
**Datum:** 4 oktober 2017

**Datum:**  
4 oktober 2017  
**Aanvraagnummer:**  
10.2.g 20173266





Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g  
10.2.e en 10.2.g  
10.2.g

**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
10.2.g 20173266  
**Bijlagen**  
2

Datum 4 oktober 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 4 oktober 2017  
Vervaldatum: 3 november 2017  
Factuurnummer: 173266

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD 10.2.g 20173266	€ 935,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.





- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
- Nee > Ga verder met vraag 3
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 11 - 2017
- Einddatum 30 - 10 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Visuele waarneming door optogenetische stimulatie van de hersenschors.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC 10.2.g
- Postadres
- E-mailadres 10.2.g

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Appendices: AP 3.4.4.1

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 10.2.e en 10.2.g

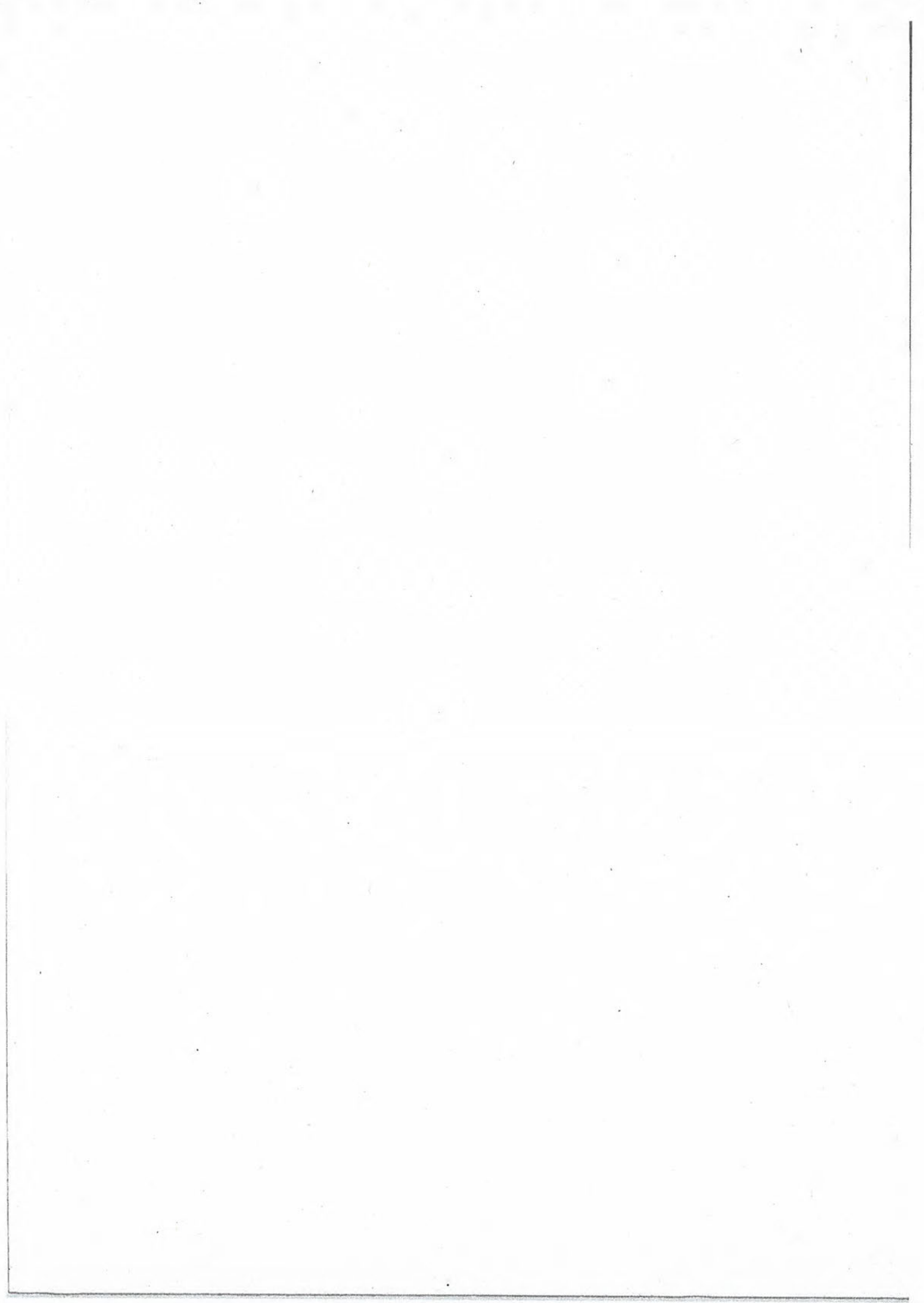
Functie 10.2.e en 10.2.g

Plaats 10.2.g

Datum 02 - 10 - 2017 10.2.e en 10.2.g

Handtekening 10.2.e en 10.2.g





10.2.e

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** maandag 30 oktober 2017 17:25  
**Aan:** 10.2.g  
**CC:** 10.2.e en 10.2.g  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD10.2.g 20173266

9

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Op 03-10-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys." met aanvraagnummer AVD10.2.g 20173266. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

#### **Niet technische samenvatting**

U geeft in de NTS aan dat dieren 'kunnen participeren in andere proeven'. Dit suggereert een zekere mate van vrijwilligheid die er niet is. U wordt verzocht dit aan te passen.

#### **Onduidelijkheden**

U geeft aan dat de dieren gedurende een periode van 2 jaar maximaal 15 keer vervoerd zullend worden naar een DM3 faciliteit elders. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is de proeven ook op die locatie uit te voeren, zodat het vervoer van de dieren beperkt kan worden.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

#### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)



**Niet technische samenvatting**

U geeft in de NTS aan dat dieren 'kunnen participeren in andere proeven'. Dit suggereert een zekere mate van vrijwilligheid die er niet is. U wordt verzocht dit aan te passen.

*We have changed the text to '...kan gebruikt worden in andere proeven'.*

**Onduidelijkheden**

U geeft aan dat de dieren gedurende een periode van 2 jaar maximaal 15 keer vervoerd zullen worden naar een DM3 faciliteit elders. Kunt u aangeven waarom het niet mogelijk is de proeven ook op die locatie uit te voeren, zodat het vervoer van de dieren beperkt kan worden.

*The viral injections described in the protocol must take place in a DM3 facility according to the current GGO legislation on the injection of AAV vectors. The reason is that the injected animal cannot be housed in a filter top cage as is common practice for AAV-injected rodents and therefore can be housed at DM2 biosafety level. Unfortunately, our institute does not possess such a high-tech facility so it is necessary to transport the animals to a primate center where a DM3 facility is available. The primate center is not a suitable location to carry out the experiments as it lacks the facilities for making electrophysiological recordings from the brain, which are a necessary part of the project. Electrophysiological recordings require a dedicated low-noise environment and high-sensitivity amplifiers, in addition to the equipment necessary to monitor eye position, present visual stimuli, or deliver rewards to the animal. The primate center does not possess such a facility or the necessary equipment.*

*The maximum number of 15 transportations is not likely to be reached by the animals in this protocol. We will pair-house the animals of the protocol (and of possible future protocols involving optogenetics) and endeavor to inject both animals during one stay at the primate center, to reduce the total number of transportations. Furthermore, it has recently come to our attention that the COGEM is planning to 'downscale' the biological safety level required for AAV vector injections in the near future. If the downscaling goes ahead it is likely that the viral vector injections can be performed in the facility at our institute. In this case the animals will no longer be transported to Rijswijk. The injection procedure itself would remain identical to that described in the original protocol. We have amended the application to allow for possibilities in changes in legislation and injections at our institute. We added the following text to page 7 of the appendix:*

*"The GGO legislation for the use of AAV viral vectors is currently being reviewed and we anticipate that injections of AAV viral vectors will be able to take place at a lower biological safety level within the course of this license. If this is the case it may be possible to perform the injections at our own institute. The monkeys would then no longer be transported to the primate facility. The rest of the injection procedure would then remain the same as described above."*



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Blindheid gaat ten koste van de autonomie en (mede daardoor) de kwaliteit van leven van mensen. Soms kan het gezichtsvermogen worden hersteld met behulp van een chip op het netvlies (retinale implantaten), maar vaak biedt dit geen uitkomst omdat de ogen beschadigd zijn, of de verbinding tussen de ogen en het brein is uitgevallen. De enige manier om in dergelijke gevallen het zicht te herstellen is een prothese die de visuele informatie vanuit een camera rechtstreeks overdraagt naar de visuele hersenschors. Camerabeelden worden omgezet in elektrische impulsen van dat deel van ons brein.
- In ons lab werken wij aan zo'n prothese. In dat verband willen we onderzoeken of het mogelijk is om de visuele hersenschors te stimuleren door gebruik te maken van optogenetica: -t lichtgevoelige receptoren worden ingebouwd in zenuwcellen in de hersenen. Door met een lichtbron te schijnen kunnen de zenuwcellen worden aan- en uitgezet. Deze techniek zou een



belangrijke aanvulling kunnen zijn op (of een alternatief voor) de techniek die gebruikt maakt van elektrische stimulatie. Optogenetica is nauwkeuriger en kan mogelijk voor een natuurlijker beeld zorgen dan elektrische stimulatie. Optogenetica is echter een nieuwe techniek, waarnaar nog veel onderzoek moet worden gedaan. Met ons onderzoekproject willen we een eerste stap maken. Het lange termijn doel is het ontwikkelen van optogenetische techniek voor toepassing in een visuele prothese en tegelijkertijd kennis verwerven over (1) de beste wijze van optogenetische stimulatie en (2) de relevante mechanismen voor visuele waarneming.

Allereerst testen wij of optogenetische stimulatie van de visuele hersenschors een waarneming kan veroorzaken. We brengen daarbij de duur, frequentie en intensiteit van de stimulatie die leidt tot stabiele waarneming in kaart. Vervolgens bieden we complexere patronen aan de hersenschors aan waarbij sommige cellen worden geactiveerd en andere juist geremd.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Bij veel vormen van blindheid zijn de ogen (of de verbinding tussen ogen en hersenen) beschadigd en kan het zicht niet worden hersteld met netvliesprothesen. Voor deze patiënten is een prothese in de hersenschors een veelbelovende oplossing. Optogenetische technieken kunnen een waardevolle aanvulling zijn op (of een alternatief voor) een prothese op basis van elektrische stimulatie. De techniek zou kunnen leiden tot een betere controle over waar wordt gestimuleerd, welke cellen en hoe lang. Dit kan beelden opleveren met een hogere scherpte en daarmee een natuurlijker beeld voor de blinde patiënt.

Het project zal bovendien bijdragen aan onze wetenschappelijke inzicht in visuele waarneming. Om bij blinde patiënten op de juiste wijze zicht te kunnen bewerkstelligen is kennis over de werking van hersencellen die van invloed zijn op ons zicht van groot belang. De respons van een hersencel op een beeldpunt in de buitenwereld bestaat uit een aantal fasen. We onderzoeken of de verschillende fasen van de respons essentieel zijn bij de bewuste waarneming van dat beeldpunt. Deze kennis is van groot belang voor de werking van de prothese.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor deze experimenten gebruiken we in vijf jaar tijd maximaal 5 resusapen.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Negatieve gevolgen voor het welzijn van proefdieren zijn 1) ongerief als gevolg van de chirurgische ingrepen verricht onder volledige anesthesie en adequate pijnbestrijding, 2) het ondervinden van stress tijdens het aanleren en uitvoeren van de taken; dit gebeurt stap voor stap om stress te verminderen.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Voor de resusapen zal het ongerief matig zijn, omdat voor de proeven operaties onder anesthesie nodig zijn. Dit niveau van matig ongerief is van korte duur. De rest van de tijd dat een aap in de proef zit, is het ongerief licht.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Een deel van de dieren kan gebruikt worden in andere proeven of kan na de proef met pensioen (zie het NCad advies over herplaatsing: <https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing>). Hergebruik of herplaatsing is afhankelijk van de doelstelling van de specifieke proef. Echter wanneer we inzicht moeten krijgen in de verspreiding van de 'optogenetische eiwitten' in het hersenweefsel wordt de aap gedood om de hersenen te onderzoeken onder de microscoop.



## 4 Drie V's

### 4.1 Vervanging

Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Om een visuele prothese te kunnen ontwikkelen moet deze getest worden in de hersenen van een proefdier dat complexe visuele taken kan uitvoeren op vergelijkbaar niveau als de mens. In vitro gekweekt hersenweefsel en computermodellen zijn daarvoor logischerwijs ongeschikt. Daarnaast is het voor het testen van een prothese belangrijk dat het visuele systeem van het proefdier voldoende lijkt op dat van de mens. De visuele hersenschors van knaagdieren is veel kleiner dan die van een mens en is op een andere manier georganiseerd. Daarbij kunnen de dieren niet leren hun ogen te richten op de voor het experiment belangrijke visuele informatie. De functie, organisatie en grootte van de hersenen van apen komen beter overeen met die van mensen, wat voor dit project essentieel is.

### 4.2 Vermindering

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

Het is onze ervaring dat we betrouwbare resultaten verkrijgen met twee of maximaal drie apen per experiment. Het voorgestelde aantal apen is het minimale aantal dat nodig is om statistisch betrouwbare resultaten te verkrijgen. Verdere vermindering vindt plaats omdat dezelfde dieren kunnen worden gebruikt in meerdere experimenten.

### 4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Alle procedures en de huisvesting van de resusapen zijn erop gericht het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Er is veel bekend over de visuele hersenschors in de resusaap en dit dier is het enige proefdier met een visueel systeem dat voldoende lijkt op dat van de mens om een visuele hersenschorsprothese te kunnen ontwikkelen.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

1) We beperken de hoeveelheid stress zoveel mogelijk door de apen geleidelijk te laten wennen aan alle aspecten van de gedragstaken. Dit is ook van belang voor het welslagen van de experimenten, omdat gestreste dieren niet of nauwelijks zullen meewerken.

2) De dieren worden getraind via een regime met gecontroleerde vochtopname. Ze krijgen de benodigde hoeveelheid vocht tijdens de training. We hanteren een zorgvuldig protocol om negatieve effecten van de gecontroleerde vloeistofopname te voorkomen. In onze ervaring leidt dit protocol tot gering ongerief en zijn er geen negatieve gevolgen voor de gezondheid.

3) Alle operaties worden uitgevoerd onder anesthesie door personen die goed zijn opgeleid en een ruime ervaring hebben. Na de operaties worden pijnstillers gebruikt om postoperatieve pijn te voorkomen.

4) De dieren worden sociaal gehuisvest in tweetallen in een verrijkte omgeving, om zo het ongerief van het leven in een kooi te beperken en om de cognitieve vermogens te verbeteren. Indien aan het einde van de proeven de dieren moeten worden gedood, gebeurt dit onder volledige anesthesie.



**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10.2.g
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. 10.2.g
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                        |
|---------------|---|
| 3.4.4.1       | Optogenetic investigations of visual perception |

*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*

#### 2 Description of animal procedures

##### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

The procedures described in this appendix concern the investigation of visual perception using optogenetic techniques.

Research questions:

- 1) Can we induce phosphene percepts using optogenetic activation of V1?**
- 2) Can we impose activity patterns onto the surface of V1 and can these patterns be interpreted as visual percepts?**
- 3) What is the role of sustained activity in the primary visual cortex in generating a visual percept?**
- 4) What is the role of higher visual areas and the feedback they send to V1 in generating a visual percept?**

The primary outcome parameters are:

i) The behaviour of the animal. The animal will be trained on a battery of different visual tasks. We will assess the effect of optogenetic manipulation on the outcome of these tasks.

ii) Neural activity. We will record neural activity using microelectrodes to assess the effectiveness of the optogenetic excitation and inhibition.

The monkeys will be acquired and acclimatized to the primate facility at the institute. They will undergo structural anatomical scans to guide the design of the surgical implants. It is critical for the success of these experiments that the monkey's head is held stationary as we need to be able to precisely measure the eye position of the animal, which is impossible if the head is moving. The animal will be implanted with a custom-designed head-post which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up.



The animals will then be placed on a controlled fluid uptake regime and trained on initial eye-movement related tasks. Once they have reached high levels of performance they will then be trained on a battery of visual tasks testing different elements of visual perception. Once trained, the animals will be implanted with a recording chamber which allows visualization of the brain through an artificial dura and easy access to the brain for microelectrodes and light. We will then use light sources to activate/inactivate the brain while the monkey performs one of the visual tasks while carrying out simultaneous neural recordings from the brain.

Animals may also be transferred to this protocol from other CCD approved licenses, but only if the animals have not experienced unforeseen serious discomfort. The animal will be implanted with a recording chamber with the condition that an individual animal can receive a maximum of two implants in their lifetime (e.g. 2 recording chambers) in addition to the head-post. See section 3.4.3 on the project proposal for more details.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

#### **Acquisition and housing**

Monkeys will be obtained from a licensed breeding facility. In all cases we will first try to obtain our animals from the national primate center. Only under exceptional circumstances (no monkeys available at the primate center) we will get them from a licenced importer. Monkeys will be housed in the primate facility at our institute. All animals are male and typically between 3-5 years of age when they arrive. This is the age at which young male monkeys typically leave their social group. We typically acquire two cage-mates together and these are then pair-housed for 3-4 weeks in a cage in isolation from the other monkeys (for quarantine reasons). When the results of viral and bacteriological tests are shown to be negative we can, if desired, pair these monkeys with established members of the group. This can be desirable to form stable pairings or larger groups (if social character of the animals allows it). Our facility contains large cages and the monkeys will have access to a floor-to-ceiling play cage, which allows them to climb and swing. The play cage also contains a 'look-out' platform where the monkeys can view other monkeys in the facility. The environment will be enriched with toys (e.g. boxes filled with nuts or sweets, which the monkeys can fiddle out) and access to natural daylight. A TV screen shall be running in front of the cages during the day. A logbook will be maintained individually for each of the monkeys, carefully monitoring their general appearance, their eating behaviour, weight, and the performance during the training sessions.

#### **Acclimatization**

*Discomfort: Mild or none*

The monkeys will be adapted to the animal housing facility and the staff. This includes but is not limited to an initial period in which the animal will be housed with a partner, will receive daily food treats from the staff, and will have access to toys in his cage and television. The total duration of the acclimatization period is approximately three months. Previously acquired monkeys in the facility have successfully undergone this period of adaptation and interact well with the staff and do not exhibit signs of stress due to their environment. During this period the monkey will receive a CT and MRI scan (see below). During one of these procedures the monkey will be fitted with a collar.

#### **CT scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

A CT scan is obtained to allow 3D models of the monkey's skull to be constructed. These are used to custom design surgical implants which perfectly fit the skull of the animal. The monkey is anesthetized in its home cage, and then transferred to the CT scanner. The scanning procedure lasts less than 5 minutes. The monkey is then returned to his home-cage, and he is allowed to recover from anaesthesia. The total duration of the procedure is approximately 30 minutes. This is typically the only CT scan required in the project. In the unlikely event that an implant comes loose, we may perform a further CT scan to assess the state of the underlying bone.

#### **MRI scanning**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)*

Structural MRI scans are obtained to localize brain structures and plan surgical implants. The monkey is anesthetized in its home cage and then transferred to the MRI facility. The anatomical scan lasts



approximately 15-20 minutes, after which the monkey is returned to his home-cage, and allowed to recover.

### **Chair training**

*Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.*

The collar will be used to gently pull the monkey into the primate chair. Food and liquid rewards will be used in order to classically condition the monkey to enter the chair. Once learnt, the monkeys usually get into the primate chair voluntarily and rapidly. Once this behaviour is acquired, the animal will initially be rewarded with fruit or fruit juice for sitting quietly in the chair for short periods of time. The time spent in the chair will gradually be increased as the animal becomes ever more comfortable and will be adjusted according to the animal's behavioural reaction.

### **Surgery: Head-post implantation**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.*

All surgeries are performed in the purpose-built primate operation room within the primate facility of the institute. Specialist anaesthetic equipment is available and the surgeries are performed by trained staff. In order to head fix our monkeys during training; a head-post is attached to the skull. The head-post is custom-designed and 3D printed to fit the skull of the animal. After induction of anaesthesia, an incision is made in the skin, and the skin is gently pulled aside, exposing the area of the skull above the cortex. The head-post is attached and the skin is sutured closed. Analgesics are given during the surgery. The duration of the procedure is approximately 1-2 hours.

At the end of the surgery, the animal is monitored and kept warm while waking up. Additional analgesics are given during the recovery period. Following the surgery, training will be discontinued for at least four weeks so that the animal may recuperate. During this time the head-post will become solidly fixed to the animal's skull as the bone integrates with the implant.

### **Head-fixation training**

*Discomfort: Mild*

The animal will receive food and juice rewards for sitting quietly in the chair with their head fixated via the implanted head-post. The amount of time spent fixated in the chair will increase progressively and will be adapted according to the behavioral reaction of the individual animal. Once the animal quietly sits in the chair with his head fixed for a sufficient period of time (0.5 hours), the animal will begin training on the basic experimental tasks. The discomfort of this procedure is mild for the first one or two times that the animal is fixated, and close to zero from then on.

### **Behavioural training on basic tasks**

*Discomfort: Mild*

To motivate monkeys to perform their task, they are placed on a fluid control regime (described below). During training, the monkey is presented with sensory stimuli and responds with an eye movement and/or hand movement. We use positive reinforcement to train the animals, correct responses are followed by a fluid reward and the animals are allowed to work until satiated. The size of the reward is individually determined and is adapted throughout the training session to ensure that the monkeys remain motivated to work. No negative reinforcement is used, incorrect trials are typically followed by a lack of reward, and in some cases a small 'timeout' (5-10s) may be given. As the monkeys learn the paradigm and their performance increases, we gradually make the task more challenging. Task difficulty is adjusted to ensure that the monkeys are able to obtain their full fluid ration during the training session. During the training periods, animals are typically in the setup 5 days per week, 1-4 h per day (typical is 2h). On very rare occasions it may be necessary to train the animal during the weekend to complete a difficult training step, in these cases the animal will never be trained for more than 12 days continuously. Training on the initial tasks typically takes between 2-6 months depending on the monkey. An example of a training task is to have the monkey direct their eye to a very small region of a computer screen for 1s (known as 'fixation'). The difficulty of the task is slowly increased by gradually decreasing the size of the area that the animal must fixate upon while slowly increasing the duration of the fixation. At the end of the training period the animal is expected to be able to fixate in a 1° diameter window for at least 400ms and perform delayed saccade-tasks. A saccade is a very rapid eye-movement that monkeys (and humans) make approximately 3 times per second to direct the eyes to objects of interest. In a delayed-saccade task the animal must wait for a 'go' cue (e.g. the fixation dot changes colour)



before making his eye movement. Some animals are also trained to make hand-movements during the training period. The duration of this training period varies from 1 to 6 months depending on the aptitude of the monkey. In our experience, all monkeys are able to learn these tasks within 6 months.

### **Controlled fluid uptake**

*Discomfort: Mild*

To motivate the animals to work their access to fluid is controlled. The main reason why we use controlled fluid uptake is that we need to obtain a sufficiently large number of trials per session, for two reasons. First, we need reliable measures of the animals' perception which demands a large number of trials. Second, we obtain a larger number of trials to study the activity of neurons. The activity of neurons is inherently stochastic, i.e. the responses of a cell to repetitions of the same stimulus are variable, a stochasticity that is inherent to proper brain function. Controlled fluid access is by the far the most common method to motivate animals to perform cognitive tasks. We note that only healthy and cooperative monkeys that are at ease will perform these tasks in which they make eye or arm movements. Alternative methods have been explored as described by a workgroup for the British NC3R center (National Center for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010). These alternatives comprise 1) positive reinforcement with fruit juice, without controlled fluid uptake; 2) food-based reinforcement; 3) electrical stimulation of reward centers in the brain. Reinforcement with juice in the absence of controlled fluid uptake works well in the early stages of training when training sessions are short and tasks simple, but it is insufficient to motivate the animal to perform more difficult tasks or a larger number of trials. Food reinforcement with treats like raisins or peanuts is used in our lab to reward an animal for compliant behavior (for instance, for coming to the correct compartment of the cage to interact with a researcher). It can also be used as reinforcement for short and simple tasks at the start of training. However, animals satiate quickly when rewarded with food and chewing movements cause artifacts in our recordings, which makes this type of reinforcement unsuitable for sessions that require many trials and precise recording of neural activity. Electrical stimulation of the reward centers involves an extra surgery with the accompanying risks of complications and direct electrical stimulation of the basal ganglia may interact with the neural processes that are the main focus of this application.

Controlled fluid uptake is thus the only viable method available to obtain sufficient numbers of trials to be able to reliably measure behavior and neural activity. We implement controlled fluid uptake in a gradual fashion that adapts the level of fluid control to the behavior of each individual. We begin with positive reinforcement using fruit juice without any controlled fluid uptake. We only use fluid control regimes if the animal is not sufficiently motivated to perform the task with no fluid control. We gradually introduce the fluid control with the aim to have the animals drink as much fluid as possible and the fluid control is only made stronger if necessary. Nevertheless, in the majority of animals it is necessary to restrict access to fluid to some level to obtain enough trials on the complex behavioral tasks described in the application. The amount of fluid control is individually determined for each monkey and we always begin by training animals without any fluid control. Most animals require some level of restricted access to fluid to motivate to perform behavioural tasks, and almost all animals require restricted access to motivate them to work on complex tasks. Our aim is to allow the animal to drink fluid during performance on the behavioral task until they are satiated. This is achieved by:

- The difficulty of the task is adjusted on each day so that the animal is able to receive fluid at a high rate, motivating him to work for more trials, and drink more fluid in total.
- The rate of fluid delivery is slowly increased during a training session to ensure that the animals drinks throughout the session.
- If the training session has to be aborted, for example due to a technical fault, then the animal receives fluid equivalent to the average intake during a training session.
- We investigate the preferences of each animal for particular rewards e.g. apple juice, different types of fruit syrup, or water, and use a reward that is appealing to the animal

We take a number of measures to prevent dehydration:

- The monkeys always receive a minimum of 100ml of fluid each day. If this amount is not reached during the training session, it is supplemented.
- Averaged over a three-day period, the animals must receive a minimum of 35ml per kilogram metabolic weight per day, this number is based on recommendations by the British N3CR (National Center for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010) and the primate facility of UC Davis (2001). For example, a 10kg animal must receive a minimum of:  $10^{0.75} \times 35 = 197\text{ml}$  of fluid per day, averaged over the previous three days. If this average is not achieved, the animal is supplemented with fluid. This is a minimum amount and the animals typically



receive much more fluid than this.

- Fluid intake, both received during training and supplemented in the cage, is logged in an electronic system accessible by researchers, caretakers and inspectors.
- The animal is provided with fruit after the training session, the liquid content of the fruit is not counted towards the minimum amount.
- During breaks in the training schedule of more than one day (e.g. weekends) the monkey receives a full water bottle of at least 700ml, animals over 15kg receive an extra bottle. If the break is only one day, then the animal receives an amount of fluid equal to what it would typically receive during a training session.
- While the animal is under fluid control, the researchers and animal caretakers monitor its appearance and behaviour carefully every day, with checks by the animal caretakers during the weekend. We weigh the monkey before and after training and compare the weight to the average weight during the last week. The weight is also checked over longer intervals to prevent a slow loss of weight. We check the monkey for any signs of dehydration such as reduced skin tension, sunken eyes, either increased or reduced activity, dry faeces. If any of these welfare criteria is abnormal, the monkey is taken out of training and provided with ad libitum access to fluid until it has recovered. In that case, the Animal Welfare Body will be informed so that they can check the animal. These criteria (weight, fluid consumed per day) are logged in an electronic system for each monkey so that the history is accessible.
- The animal receives a non-working period once every 9 weeks (on average over a year). During this period the animal is not trained and receives a full bottle each day (>700ml).

The British NC3R center investigated in 2010 the use of controlled fluid regimes in brain research with macaque monkeys (Prescott et al., 2010). Their conclusion was that, when a controlled-fluid protocol is carefully applied and monitored, there are no negative consequences for the health of the animal. Follow-up research from the University of Newcastle (Gray et al., 2016) showed that controlled fluid uptake for 7 days per week did not lead to abnormal blood values or signs of dehydration. Another study (Hage et al., 2014) analyzed a broad range of behaviors over several months during fluid control and found no evidence for alterations in behavior, which indicates that the animals' wellbeing can be stably ensured during training sessions with a proper protocol. Indeed, from their general appearance, it is very difficult, if not impossible, to distinguish between monkeys under fluid control and monkeys with ad libitum access to water. Furthermore, the animals are seen regularly by a veterinarian to inspect their general condition, and we investigate measures of kidney function during the yearly checkups. We have never obtained indications of impaired kidney function. Hence, our own experience is in accordance with the literature, which indicates that a careful protocol of controlled fluid uptake is a safe and effective manner to motivate animals to perform the required cognitive tasks.

Gray et al., 2016. Physiological, Behavioral, and Scientific Impact of Different Fluid Control Protocols in the Rhesus Macaque (*Macaca mulatta*). *eNeuro* 3(4).

Hage, S.R., Ott, T., Eiselt, A.-K., Jacob, S.N., Nieder, A., 2014. Ethograms indicate stable well-being during prolonged training phases in rhesus monkeys used in neurophysiological research. *Lab. Anim.* 48, 82–87.

Prescott M.J., Brown V.J., Flecknell P.A., Gaffan D, Garrod K, et al., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. *J. Neurosci. Methods* 193, 167–88

University of California Davis, 2001. Policy statement: water restriction in rhesus behaviour studies. UC Davis Office of Environmental Health and Safety.

### **Behavioural training on complex tasks**

*Discomfort: Mild*

The animals will be trained on a battery of different complex visual tasks. The animals will be trained to switch between different tasks so that multiple tasks can be used on a single day. The tasks will include the following paradigms:

#### *Phosphene detection task:*

In this task the monkey is trained to make saccades towards small spots of light presented on a computer monitor. Catch trials (no light present) are also present on a percentage of trials. After



implantation of the recording chamber, the visual stimulation will be replaced on a percentage of trials by optogenetic stimulation. This tests whether the animal perceives a spot of light after optogenetic stimulation.

**Task battery:**

In addition, we will test the monkeys on a range of tasks, which include, but are not limited to: (1) Shape discrimination task. The monkey reports the shape of a stimulus with an eye-movement response. We will also test if optogenetic stimulation can be used to impose patterns in the visual cortex that are interpreted as shapes. (2) Memory and localization tasks. The animal sees a small spot of light. After a delay a set of choice options are presented and the animal should select the target which matched the location of the sample. The difficulty is varied by varying the spacing of the choice options. Another task in this category tests qualitative properties of phosphene perception, such as the size or color of the phosphene. The monkey is trained by presenting a sample, a small spot of light of a given size or color. After a delay a range of options are presented and the animal must select the option which was closest in appearance to the sample. (3) Tasks probing feedback from higher areas to lower areas (related to sub-aim #4). One example is a figure-ground segregation task, where the monkey is trained to make an eye-movement to the centre of a textured figure, presented on a textured background. Another example is a curve-tracing task, where monkeys mentally trace one of a number of curves. Based on the effects of optogenetic stimulation, other tasks may be added to the task set.

These tasks are complex and require long periods of in which the eyes have to be accurately directed towards a fixation point. The animals must monitor locations away from where the eyes are directed and memorize the perceptual qualities of phosphenes. Furthermore, the monkey must rapidly switch between these tasks on a single day. These properties make these tasks too complex to be performed by non-primate species.

**Surgery: Recording chamber implantation and craniotomy**

*Discomfort: Moderate for 2-3 days, becoming mild for 1 week.*

10.1.c

[Redacted text block]

10.1.c

10.1.c

[Redacted text block]



10.1.c

**Surgery: Injection/infusion of viral vector**

*Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)*

After recovery from the implantation surgery (minimally 2 weeks) the monkey will be anesthetized. Injections will either be made through the artificial dura using a glass pipette or through the native dura using an injection needle. Viral vector injections may be repeated at later time-points. If larger volumes of vector are required, then 'convection enhanced delivery' techniques will be used: A thin cannula will be inserted into the brain and an infusion pump will be used to slowly deliver the viral vector into the brain. The total number of viral vector injection/infusion sessions is limited to a maximum of 5 per recording chamber.

**Transport and temporary housing at DM3 level.**

*Discomfort: Mild*

During injections/infusions of viral vectors, it is **currently** necessary to move the monkey to a DM3 biological safety level facility **due to GGO legislation**. To this aim the animals will be transported to a primate DM3 facility in the Netherlands. Animals will always be transported and housed together with their cage-mate (who will also be assigned to this license) to reduce social stress. The animals will first be trained to sit quietly in the specialized transportation cage for periods of 1-2 hours by associating the transport box with positive rewards such as fruit. They will consequently not be anesthetized during the transportation and experience only mild discomfort. The animals will be housed for a minimum of 7 days in the DM3 facility. After this period the animals may be returned to the home institute contingent upon a negative blood test (qPCR) for viral shedding in the blood circulation of both animals. Based on the rate of shedding of viral particles in macaques (Ciron et al., 2009; Nathwani et al., 2002), it is likely that the blood-test will be negative in the range of 7-14 days after the injection. We therefore anticipate that the animals will remain for 7-14 days in the DM3 facility after each injection/infusion.

**The GGO legislation for the use of AAV viral vectors is currently being reviewed and we anticipate that injections of AAV viral vectors will be able to take place at a lower biological safety level within the course of this license. If this is the case it may be possible to perform the injections at our own institute. The monkeys would then no longer be transported to the primate facility. The rest of the injection procedure would then remain the same as described above.**

To determine whether the opsin is successfully transfected it is possible to visualize the fluorescent marker protein that is linked to the opsin through the transparent dura. This is achieved by using a portable fluorescence microscope or goggle system. This procedure can be performed while the monkey is in the primate chair and does not cause any discomfort. It is highly likely that the vector we use will successfully transfect cells and drive expression of the opsin protein as we will use promoter sequences and serotypes that have been successfully used in primates in other labs. If it turns out that the first injection does not produce expression, despite a successful injection, we will change the serotype or promoter sequence in future injections.

It is likely that the expression of the opsins will remain in a useable range for periods of 4-8 months, and the total duration of the experiments with a given recording chamber may last for up to two years. We estimate therefore that a maximum of five injection/infusion procedures per recording chamber will be required giving a maximum of 10 injections in total. Monkeys may be transported to the primate center to act as cage-mates without being injected with virus. To keep the number of transportations to a minimum we will, where possible, inject both monkeys during a single session. We limit the total number of transportations to and from the primate center to 15 for an individual monkey. Recording sessions /



**Optogenetic experiments**

*Discomfort: Mild*

The optogenetic stimulation and neural recording sessions follow an identical format to a behavioural training session, with the exception that the monkey is connected to the recording/stimulation equipment. Optogenetic stimulation itself does not cause any extra discomfort. The animal's will perform the same tasks as outlined above. The duration of each session will be between 1-4 hours. The total duration of the recording sessions will be between 9 months to 2 years per chamber, although the implants remain useable after this time-period. To activate the opsin in the optogenetic experiments a light-source will be placed in close proximity to the transfected neural tissue. The light-source will be briefly illuminated (<1s) and the power of the light will be carefully monitored to ensure that no heat damage occurs. To monitor neural activity, thin laminar electrodes will be moved across the (artificial) dura into the brain using a micromanipulator. These electrodes contain multiple contacts which allow simultaneous recordings of neural activity at all cortical depths. At the end of each session the electrode will be removed and the chamber will be resealed with a tight-fitting lid and bone wax.

**Artificial Dura 'refresh' operation**

*Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)*

Tissue regrowth underneath the AD eventually causes the AD to become opaque. To restore the AD to its original condition we will remove the original AD, gently remove the underlying tissue and then implant a new AD. This procedure will be performed under light anaesthesia and lasts less than 1 hour. We estimate that this will be necessary once in a six-month period and will be performed maximally five times per chamber.

**Surgery: Restorative surgeries**

*Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.*

In rare cases an implant (i.e. head-post, electrode array connector or recording chamber) may become loose. A repair surgery is then performed to prevent failure of the implant. The repair surgery is performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. The nature and duration of the repair surgery depends upon the type of implant and the extent of the problem. An individual monkey can undergo a maximum of two restorative surgeries per implant (including the head-post) during the course of these procedures. Repair surgery will always be performed in consultation with the Animal Welfare Body (IvD) and (if necessary) the veterinarian.

**Surgery: Implant removal**

*Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.*

Monkeys that have reached the end of the experiment and that will not be re-used in other experiments are sometimes kept at the institute because of social bonds that the monkeys have formed with other animals, or because they are particularly social animals that are useful for acclimatizing young animals. In these cases, the implants (recording chambers and head-post) are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia if possible. The skin is resutured over the location of the implants and in our experience the animals recover fully from the procedure.

**Annual health-check**

*Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia).*

Once per year, each animal in our facility is checked by the veterinarian to assess their general health and appearance and to take blood samples for further testing. In this way the long-term health of the animals is closely monitored. The animal is lightly anesthetized during this procedure which takes 10-15 minutes per animal.

**Perfusion**

*Discomfort: Mild*

We aim to assess opsin expression in vivo using a portable fluorescent microscope or goggle system (see above). If this proves insufficient to assess the extent of the expression of the opsin proteins then it will be necessary to verify the expression using ex vivo histological methods. In this case the monkey will be



ethanized at the end of the experiments. The animal will be given an overdose of barbiturates and cardially perfused with a fixative.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

The statistics in our studies are performed across neurons and behavioural trials, and we perform multiple recording sessions per animal meaning that we can acquire sufficient numbers of neurons with only two animals. Two is the absolute minimum number of animals that can be used to check for consistency across animals and is accepted as the norm in primate research. Although we have good experience with most of our monkeys, some individual circumstances may preclude a monkey from being used for a specific experiment (e.g. if he is not able to learn one of the behavioural tasks), or ambiguous results may require measurements in a third animal. In such cases, we will apply to the Animal Welfare Body (IvD) of the institute for permission to use a third monkey.

### **B. The animals**

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

#### **Species used:**

We will use rhesus macaque monkeys (*Macaca mulatta*) in these experiments. All monkeys are obtained from a national primate center, or in exceptional circumstances (i.e. if no animals are available from a primate center) from a licensed importer. Monkeys are typically acquired aged 3-5 years. This project investigates processing in the brain using optogenetics and recording chambers. Due to the invasive nature of the procedure it is not possible to do the experiments in humans. The tasks that the animals will perform involve maintaining fixation while attending to other locations, as well as remembering the location of visual targets for several seconds and making eye movements to texture-defined objects. These tasks are too complex to be performed by rodents or larger mammals such as cats and pigs. In particular it is not possible to train non-primate species to fixate their eyes on one location of the visual field while requiring them to attend to a separate location. This requirement is essential for these experiments which require the animal to monitor the perceptual qualities of phosphenes presented away from the point of fixation. Rhesus monkeys have a neuroanatomy that is highly similar to that of humans and they can be trained to perform these more complex cognitive tasks. Given the similarity to human neuroanatomical organisation and the existing body of data that is available on psychophysical capacities and neurophysiological responses (Bough, 1970; Cowey et al., 1975; 10.2.e en 10.2.g) the rhesus monkey is the appropriate model for the present study. This project also requires some preliminary testing of viral vector efficiency; this work will be done in mice under our existing CCD license. Vectors will only be used in monkeys if they are shown to be effective in mice.

#### **Sex used:**

We exclusively use male monkeys in these studies. Our facility houses only male monkeys as males adapt better to living in paired social housing than females and there are no possible complications with breeding that would be present with female animals. The choice for males will not affect the results of the study as it is highly unlikely that there are differences between the sexes in how optogenetic excitation/inhibition influences visual perception. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.

#### **Animal number:**

We expect that at least two animals are necessary in order to obtain reliable results for each experimental question considered. When comparable data is obtained from two individuals it can be assumed that the results are not attributable to individual differences. Previous studies have obtained reliable results from two animals, but given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. It could be possible that data from one animal must eventually be excluded from the analysis, contradictory results arise from the first two monkeys, or ethical considerations require the termination of one animal (humane endpoints). Such cases require the acquisition of data from a third animal. The acquisition of a third animal for a particular research question will be performed in consultation with the IvD of the institute. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 projects a third monkey was required (22% chance).

The experiments described here will be used to address the four different sub-aims outlined in the main body of the proposal. The experiments have been designed so that sub-aims #1-3 can be answered in the same animal(s) as these all involve optogenetic modulation of activity in V1. Sub-aim #4 requires