

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 α -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 1200mm² in surface area whereas mouse V1 is approximately 6mm², 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

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



Advies aan CCD

B

Datum 16 november 2017
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20173266

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e en 10.2.g
Project: Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.
Aanvraagnummer: AVD20173266
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	Er zijn geen bijzonderheden geweest.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		5	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Niet menselijke primaten

Huisvesting anders dan volgens bijlage III van de richtlijn.
CITAAT.


-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.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception / Rhesusapen (Macaca mulatta): CITAAT. 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.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
Maatschappij	11.1 

2 DEC advies

DEC-advies	<p>CITAAT.</p> <p>-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.</p> <p>De DEC komt tot de conclusie dat voor het bereiken van de doelstelling resusapen (Macaca mulatta) de inzet van resusapen noodzakelijk is.</p> <p>-De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan</p>
-------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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 GGOs 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.

-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 vervolgent experimenten 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.

-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.

-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.

Ethische afweging van de DEC:

1- 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. 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. 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:

- o 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.

- o 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.

- o 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.

- o 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.

- o 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.

o 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.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij
- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden
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.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
De DEC heeft de aanvrager vragen gesteld over de volgende onderwerpen: onderbouwing gebruik apen, de status van het onderzoeksveld, veiligheid van het gebruik van virale vectoren, strategie en selectie kooimaatjes.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:
CITAAT. 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.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies

Het DEC advies is helder en goed onderbouwd. De DEC geeft dilemma's op helder wijze weer.

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>CITAAT.</p> <p>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.</p> <p>We can subdivide this main aim into four sub-aims:</p> <ol style="list-style-type: none">1) Can we induce phosphene percepts using optogenetic activation of V1?2) Can we impose activity patterns on 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?
-------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>CITAAT.</p> <p>Scientific relevance</p> <p>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.</p> <p>Social relevance</p> <p>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.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	11.1

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>De DEC zegt hierover het volgende: 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.</p> <p>De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.</p> <p>11.1</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3V's

Vervanging

3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception: CITAAT. 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 1200mm² in surface area whereas mouse V1 is approximately 6mm², 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.

Verminderen	
	<p>3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception: CITAAT. 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.</p>
Verfijnen	
	<p>3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception: CITAAT. 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.</p>
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception: CITAAT. 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.

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.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception	HEP: 0-5%	<p>CITAAT. 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.</p> <p>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.</p> <p>If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized.</p>
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

11.1

In het project worden non-humane primaten gebruikt. Het Secretariaat is van mening ^{11.1}

De aanvrager geeft aan dat hergebruik van toepassing is. In het projectvoorstel wordt middels een figuur uitgelegd welke dieren wel/niet voor hergebruik in aanmerking komen. In de bijlage dierproeven wordt daarnaast nog aangegeven dat er zich geen onvoorziene omstandigheden hebben voorgedaan in de voorafgaande experimenten waarbij sprake was van ernstig ongerief. Dit is volgens het Secretariaat ^{11.1} Hoewel de DEC ook van mening is dat er door de aanvrager voor hergebruik heldere voorwaarden zijn geformuleerd, benoemt de DEC wel het dilemma dat het

ongerief per dier toe zal nemen. De DEC vraagt zich af of de toename van het ongerief per dier opweegt tegen de vermindering van het aantal dieren. De DEC volgt de motivering van de aanvrager, maar is van mening dat het denkbaar is dat het gebruik van meer dieren te prefereren is.

De DEC geeft daarnaast nog 2 andere dilemma's weer: de problematische inschatting van het ongerief en de opvang van de dieren na afloop van de proef versus het doden van de dieren. Het Secretariaat ^{11.1}



Er is sprake van de volgende bijzondere categorie handelingen: Huisvesting anders dan bijlage III van de richtlijn.

-Hoewel dieren in principe in tweetallen worden gehuisvest, zullen ze na de operatie gedurende enige dagen individueel gehuisvest worden om herstel te bevorderen. Het Secretariaat is van mening dat ^{11.1}



-Dieren worden gedurende de proef vervoerd naar een DM3 faciliteit voor primaten elders in Nederland ^{10.2.g} [redacted] Dit is nodig vanwege het gebruik van virale vectoren. De dieren verblijven daar gedurende 7 dagen samen met het kooimaatje. Gedurende het transport verblijven de dieren in een transportkooi (max 2 uur). De dieren zullen gedurende het project (in een periode van 2 jaar) maximaal 15 keer vervoerd worden naar de DM3 faciliteit. Uit het projectvoorstel maakt het Secretariaat op dat ^{11.1} [redacted] [redacted] De dieren worden niet verdoofd gedurende het transport en, om stress te voorkomen, worden de dieren samen met hun kooimaatje getransporteerd.

De aanvrager geeft aan alleen mannelijke dieren te gebruiken. Alle dieren in de faciliteit zijn mannelijk. Dit in verband met het vormen van duo's voor de huisvesting. Dit is ook bij eerdere aanvragen geaccepteerd.

De aanvrager geeft aan dat er overlap is met een lopend DEC protocol: 1 van de dieren is momenteel al opgenomen in de studie. De aanvrager geeft verder aan dat, indien deze aanvraag wordt vergund, het desbetreffende dier naar deze vergunning zal worden overgezet. In lijn met eerdere aanvragen, adviseert het Secretariaat ^{11.1} [redacted] [redacted]

Vanwege het gebruik van non-humane primaten, dient een beoordeling achteraf plaats te vinden.

^{11.1} [redacted]

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

^{11.1} [redacted]

[redacted]

11.1

[Redacted text block]

[Redacted text line]

[Redacted text block]

11.1

[Redacted text block]

[Redacted text line]

[Redacted text line]

[Redacted text line]

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

10.2.e en 10.2.g

From: info@zbo-ccd.nl
Sent: donderdag 16 november 2017 10:01
To: 10.2.g
Cc: 10.2.e en 10.2.g
Subject: Aanhouden AVE10.2.g 20173266

14

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 AVI10.2.g 20173266.

De CCD heeft een besluit genomen over uw aanvraag.

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de leges hebben ontvangen.

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

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

.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

10.2.g

16

Van: [secretariaat DEC](#)
Aan: ["info@zbo-ccd.nl"](mailto:info@zbo-ccd.nl)
Cc: 10.2.e en 10.2.g
Onderwerp: Leges en factuur 10.2.g 20173266
Datum: donderdag 16 november 2017 16:58:07
Bijlagen: [74242.pdf](#)
[Ontvangstbevestiging 73593.pdf](#)

Beste 10.2.e

N.a.v. je brief (zie document 74242). Is het misschien mogelijk dat de ontvangstbevestiging (zie bijgaande scan) niet is vergezeld met de factuur? Wij kunnen dat niet goed nagaan omdat de onderzoeker en ik niet de echte ontvangstbevestiging te zien krijgen. Mogelijk is er bij het bureau 10.2.g een fout gemaakt bij het inscannen of de factuur is niet gestuurd?

Mag ik je vragen om de factuur (nogmaals) te sturen zodat we kunnen betalen?

Groet 10.2.e en 10.2.g

From: DIV e-mail

Sent: donderdag 16 november 2017 10:46

To: secretariaat DEC

Cc: 10.2.e en 10.2.g

Subject: 2017-11-16 Inkomende post 10.2.g

Goedemorgen,

Hierbij de post van vandaag.

Met vriendelijke groet,

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

15



18

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

10.2.g



21 NOV. 2017

Datum 20 november 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
centralecommissiedierpro

10.2.g 000 28
@zbo-

ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 10.2.g 20173266
Bijlagen
1

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Op 3 oktober 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 AVD 10.2.g 20173266. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 november 2017 tot en met 30 oktober 2022.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Voorwaarden

Aan de vergunning hebben wij voorwaarde(n) verbonden op grond van artikel 10a1 lid 2 van de wet. Deze voorwaarde(n) vindt u in het deel 'Projectvergunning' van dit besluit. Onder 'Overwegingen' lichten wij toe waarom wij deze voorwaarde(n) aan de vergunning verbinden.

Procedure

Datum:
20 november 2017
Aanvraagnummer:
AVC10.2.g 20173266

Advies dierexperimentencommissie

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g gevoegd. Dit advies is ontvangen op 3 oktober 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

10.2.g

Nadere vragen aanvrager

Op 30 oktober 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op het vervoer van de dieren naar een andere locatie en de NTS. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Overwegingen

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de DEC. In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven en zijn hieronder toegelicht. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Voorwaarden

U geeft in uw aanvraag aan dat er sprake is van overlap tussen de in deze vergunning vergunde dierproeven en eerder goedgekeurde DEC protocollen. Om deze overlap te voorkomen hebben wij een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd. De dieren en experimenten die momenteel onder de eerder goedgekeurde DEC protocollen vallen, zullen na het verlenen van de vergunning formeel onder deze vergunning gaan vallen.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1 sub d van de wet. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2023 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

Bezwaar

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

10.2.g

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

Datum:
20 november 2017
Aanvraagnummer:
10.2.g

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

10.2.g

Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: 10.2.g [redacted]

10.2.g

Adres: 10.2.g [redacted]

Postcode en plaats: 10.2.g [redacted]

Deelnemersnummer: 10.2.g

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 november 2017 tot en met 30 oktober 2022, voor het project "Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys." met aanvraagnummer

10.2.g [redacted] volgens advies van Dierexperimentencommissie 10.2.g [redacted]

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 10.2.e en 10.2.g [redacted]

Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 oktober 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 3 oktober 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception, zoals ontvangen op 10 november 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 10 november 2017;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 3 oktober 2017
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 10 november 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Optogenetic investigations of visual perception			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	5	100,0% Matig

Voorwaarden

Beoordeling achteraf

In dit project worden dierproeven toegepast waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 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.

Bijzondere voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

10.2.g

formeel onder deze vergunning gaan vallen, zoals u in uw aanvraag ook heeft aangegeven. Hierdoor is er geen sprake meer van overlap.

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

10.2.g

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:

10.2.g 20173266

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.

Levensloofdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

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

Aanvraagnummer:

10.2.g

mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: 10.2.g
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag 10.2.g 20173266
Datum: maandag 27 november 2017 14:09:26

Geachte DEC 10.2.g

Op 03-10-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Optogenetic investigations of visual perception in macaque monkeys.' met aanvraagnummer 10.2.g 20173266.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. Dit betrof het vervoer van de dieren naar een andere locatie en de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl



Niet-technische samenvatting 20173266

20

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. *U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- 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

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 proefdiervrije 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

28 november 2017

Beoordeling achteraf

Ja

Andere opmerkingen

Nee

Inventaris Wob-verzoek W21-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document NTS20173789	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier, d.d. 1 november 2017				x		x	x	
2	NTS (versie 1)			x					
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage dierproeven 2				x			x	
6	Ontvangstbevestiging en factuur, d.d. 2 november 2017				x		x	x	
7	Aanvraagformulier, versie verzonden per post, d.d. 2 november 2017				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Interne adviesnota, d.d. 1 december 2017				x		x	x	x
10	E-mail van CCD aan vergunninghouder - Verzoek om aanpassing NTS, d.d. 11 december 2017				x		x	x	
11	E-mail van CCD aan DEC - vraag over DEC-advies, d.d. 11 december 2017				x		x	x	
12	E-mail van DEC aan CCD - reactie op vraag over DEC-advies, d.d. 11 december 2017				x		x	x	
13	Automatische melding van ontvangst nieuw document, d.d. 18 december 2017				x			x	
14	E-mail van DEC aan CCD - begeleidende e-mail bij reactie op verzoek om aanpassing NTS				x		x	x	
15	Begeleidende brief bij aanpassing NTS				x		x	x	
16	NTS (versie 2)			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, 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
		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	
		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 <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.e en 10.2.g
		Afdeling	10.2.e
		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 <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.e en 10.2.g
		Afdeling	10.2.e
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

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 en 3.4.4.2

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
Functie	
Plaats	10.2.g
Datum	__ - 10 - 2017
Handtekening	

De hersenmechanismen die aandacht sturen zijn grotendeels onbegrepen. Studies met functionele magnetische resonantie imaging (fMRI) in mensen hebben een netwerk van hersengebieden geïdentificeerd dat betrokken is bij het richten van de aandacht. Deze studies leveren echter geen informatie over hoe deze neurale netwerken de aandacht sturen. Voor een beter begrip van de aandachtsturing willen we in resusapen de relevante hersengebieden met behulp van fMRI nog beter in kaart brengen om vervolgens de activiteit van de betrokken zenuwcellen te registreren en te beïnvloeden.

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

Dit onderzoek levert nieuwe wetenschappelijke inzichten in de netwerken die betrokken zijn bij de aandachtsturing, begrip van de processen die de hersenen laten schakelen tussen meerdere taken en begrip van de invloed van aandacht op de opslag van informatie in het korte-termijn geheugen. Aandacht is een van de hoekstenen van onze denkprocessen en daarmee een essentieel onderdeel van vrijwel elk aspect van menselijk gedrag. Beter begrip over hoe stimuli aandacht vangen en hoe aandacht wordt gestuurd en toegewezen aan taken is van belang voor een groot aantal terreinen. Dit geldt voor verkeersveiligheid en het ontwerp van complexe interfaces tussen mens en machine (denk bijvoorbeeld aan medische apparatuur) en ook voor neurologische en psychiatrische aandoeningen. Stoornissen in de aansturing van aandachtsprocessen dragen in belangrijke mate bij aan ADHD, autisme, schizofrenie en de ziekte van Alzheimer. Een beter begrip van de normale werking van aandachtsprocessen verschaft daarom inzicht in de symptomen van deze ziekten en is daarmee van belang bij toekomstige behandelingen voor deze ziekten.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor dit onderzoek gebruiken we in vijf jaar tijd maximaal 11 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) een aantal dieren ondervindt stress tijdens het transport naar een primaten centrum voor de toediening van vectoren.

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 geclassificeerd als licht.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Een deel van de dieren kan na afloop van de proef gebruikt worden in andere proeven. Het is mogelijk dat een deel van de dieren na de proef met pensioen kan (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 willen krijgen in de locaties van elektrodes of de verspreiding van de 'fluorescente eiwitten' in het hersenweefsel wordt de aap onder diepe narcose gebracht en gedood om de hersenen te onderzoeken onder de microscoop.

4 Drie V's

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

macaque monkeys of which a maximum of 5 will be newly acquired.

We live in a complex world in which our attention is divided between many tasks that all have to be performed seemingly simultaneously. Consider a cyclist, rushing to get to a work meeting, planning what they will say at the meeting, texting the office to say they will be late, having their attention captured by a colorful advert for a new phone, and all the while pedaling and navigating through busy traffic. Their brain is being assailed by a vast array of different sensory inputs which have to be assigned different levels of priority. Attentional control networks must determine what to pay attention to and how to divide cognitive resources across all the different tasks. This capacity to attend to particular input streams and divide resources between tasks is considered to be one of the most high-level functions of the brain. Attentional control is particularly strongly developed in primates compared to other mammals and plays a large part in the success of our species. Although our research is directed to the fundamental question of how attentional control works, it is of importance for our understanding of a crucial cognitive function that is impaired in many diseases. Failures of the attention control circuitry play a role in disorders such as Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autism spectrum disorders. Furthermore, the disturbance of these control circuits explain many symptoms of Schizophrenia and Alzheimer's disease (Munoz and Everling, 2004), and the impairments of attention shifts often observed after strokes (Corbetta and Shulman, 2011).

Our understanding of the neural circuits that control the deployment of attention is largely incomplete. Studies of human behavior and functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies have led to the generation of several hypotheses about the brain circuits that deploy and direct our attention. Notably, fMRI studies have identified a fronto-parietal circuit that is involved in shifts of attention (Corbetta, 1998). This circuit strongly overlaps with the circuit responsible for directing eye gaze direction leading to the idea that spatial attention and eye-movement generation rely on closely related neural circuits (Rizzolatti et al., 1987). Unfortunately, the temporal and spatial resolution of fMRI make it impossible to further dissect this circuitry to identify the precise neural mechanisms by which attention is controlled. In this study we will investigate four key components of attentional control by measuring neural activity in macaque monkeys performing attentional tasks.

#1 - The brain areas which control attention

To elucidate the brain mechanisms that control attention, we need to examine the activity of individual neurons in experimental animals that carry out tasks requiring attention shifts and to modulate the activity in the circuits that control attention. Electrophysiological studies in macaque monkeys have identified cells in the frontal eye fields (FEF), a region involved in eye movement control, that create attention-like effects in early visual areas when stimulated, suggesting that these neurons may be a source of attentional control signals (Moore and Fallah, 2004). Our lab is world-renowned for providing insights into the role of attention in object perception. One example task that provided important insights into the mechanisms of attention is the curve-tracing task [10.2.e en 10.2.g](#)

In the curve-tracing task a monkey has to keep his eyes directed to a small circle ('fixation point') at the center of a computer screen while mentally tracing a curve that is connected to the fixation point (the 'target curve') to locate a larger circle at the other end of the curve, while ignoring a distractor curve and a distractor circle (Figure 1). To solve this task, the monkey gradually spreads his attention along the target curve until it reaches the larger circle. The spreading of attention is evident in the activity of cells in early visual areas. Primitive visual features, such as fragments of the curves, drive the activity of many cells in the primary visual cortex (V1) when they fall onto a small region of the retina known as their receptive field (RF). When the target curve falls in the RF then the activity of the cell is greatly enhanced compared to when the distractor curve falls in the RF. This enhancement of neuronal firing rates is caused by the attentional shift. The enhancement of neuronal activity occurs later if the RF is further along the target curve; and the modulation strength can be used to predict the errors that the monkeys make on the task. Surprisingly, the enhancement of neuronal activity due to the attentional shift arises simultaneously in both FEF and early visual areas [10.2.e en 10.2.g](#). This seems to go against the idea that FEF is the 'source' of attentional modulation and V1 is the 'target' but rather that attention is controlled by a network of areas that rapidly communicate with one another. In this project, we will identify which cortical and sub-cortical brain areas determine attentional shifts in attention demanding tasks such as the curve-tracing task, using fMRI in macaque monkeys. We will then investigate the neural activity in these regions using targeted electrode recordings to understand the dynamics of the spread of attention across the network. Understanding how these widespread cortical networks function is of fundamental importance. This knowledge is also crucial for insight into brain diseases, as these long-range cortico-

To better understand attention control, the project will also address how the brain allocates its attentional resources in a dual-task situation. To uncover the neuronal processes that are responsible for the bottleneck, we will make use of the so-called Psychological Refractory Period (PRP) paradigm in which a primary task (e.g. is an auditory tone high or low pitched?) is followed at different delays by a secondary task (e.g. what is the orientation of a visually presented line?). Studies have shown that performance on the secondary task is impaired if the delay between the two tasks is very short – this is when they interfere. Competing theories have emerged to explain this result. Some scientists hold that attention can only be directed to one task at a time, meaning the secondary task is delayed while attention is engaged on the first task but others suggested that attention is divided between the tasks. We have recently shown that in a multiple decision making task, evidence for multiple decisions can be gathered in parallel, as long as the number of decisions does not exceed a critical value [10.2.e en 10.2.g](#). We will now determine the neuronal processes that cause the bottleneck by recording neural activity in the visual and frontal cortex while monkeys perform the PRP task.

#3 - Interactions between working memory and attention

In attention control, the capacity to memorize information, such as task instructions, is crucial. This type of memory is occasionally lost in normal people and we all have experienced the unpleasant feeling of "what was I doing". The probability of losing information in working memory increases in diseases causing cognitive impairments such as Alzheimer's disease. One example task that requires working memory to control attention is visual search. Imagine looking for the button "submit" on a webpage. We need to keep the identity of the word "submit" active in our working memory. This word in memory acts as a search template that guides our attention to the appropriate location on the webpage. Thus, working memory controls attention. The converse also occurs because attention also influences what is stored in working memory. Specifically, attention seems to be the 'gatekeeper' that allows items into short-term memory. Attention can also be used to promote items from very brief forms of memory, known as iconic memory, into a more long-lasting form of memory known as working memory. We recently demonstrated that the circuits in the brain for the control of attention and working memory are largely overlapping [10.2.e en 10.2.g](#) but the neural substrates that allow attention to select particular memory traces are unknown. In this project, we will investigate the interactions between attention and working memory. In particular, we wish to understand if the same neural structures that implement attentional control towards external stimuli are also able to direct attention towards different memory traces.

#4 - The role of eye-movement control centers in directing attention

As described above there are close links between the control of overt eye-movements towards behaviorally relevant objects and covert shifts of attention that occur without moving the eyes. The eye-movement control system, including cortical areas such as the lateral intra-parietal cortex (Egeth and Yantis, 1997), the frontal eye-fields (Schall et al., 1995) and the sub-cortical superior colliculus (Fecteau and Munoz, 2006), are thought to be key areas in controlling the deployment of attention with and without eye movements. We have previously demonstrated that neural activity in the frontal eye fields is modulated by the location of attention in the curve-tracing task at approximately the same time as activity is modulated in the primary visual cortex (Figure 1). This surprisingly finding goes against the main-stream view that the frontal cortex acts as the main control center for directing attention, but we do not yet understand how this simultaneous modulation of activity throughout the brain can occur. Sub-cortical areas such as the superior colliculus may be key players in distributing attentional signals widely throughout cortex and in this sub-aim we will simultaneously record from and perturb activity in cortical and sub-cortical regions [10.2.e en 10.2.g](#) to elucidate how these structures interact during tasks that demand attention shifts and eye movements.

Together these four components will help us to form a unified understanding of how attention is controlled and deployed in the brain. We will learn which brain areas are involved in controlling attention, how these brain areas act to divide attentional resources between different tasks, to store the attended items in memory and how attentional signals are distributed throughout the brain to produce a coherent set of task-directed actions.

spatial scale and to perturb activity using electrical microstimulation, pharmacology or optogenetics to better understand the causal role of these areas in attention control.

#2) How does the brain divide resources when performing two tasks simultaneously?

We will use dual task paradigms (like the PRP paradigm described above) to study how the simultaneous performance of multiple tasks affects neural activity in the visual and frontal cortex. We aim to investigate neural activity in high-level control centers simultaneously with studying their effects on low-level visual areas.

#3) How is attention directed towards items in memory?

We will use tasks that demand interactions between attention and working memory and that also rely on iconic memory. We will determine how attention gates the storage of briefly presented visual stimuli in working memory and how working memory influences the deployment of attention:

#4) What is the role of eye-movement control centres in the deployment of attention how do these centres work together with the visual cortex during attention shifts?

We aim to record from key cortical and sub-cortical areas during attention-related tasks to determine the interactions between the visual and frontal cortex and subcortical structures for controlling eye movements.

We have chosen these four sub-aims as they address key aspects of the central question of how attention is controlled and deployed by the brain. By answering these sub-aims we will provide a unified overview of attention is controlled by the brain.

Feasibility of the projects

We have a great deal of experience training macaques to perform complex visual tasks. We have experience in training monkeys to perform tasks that demand attention shifts and to keep information in working memory, tasks that are composed of subtasks for the study of dual-task interference and tasks in which monkeys make one or multiple eye movements. A number of these tasks are also part of studies under active DEC licences (see section 3.4.3 for further details). We have many years of experience in performing the surgical interventions and perturbation methods required to answer each of the sub-aims and we also have experience performing fMRI studies with macaques.

Our lab is situated in an excellent research environment, where the facilities that are required for this project are available including a state-of-the-art primate facility and operation room. Our lab utilizes a variety of techniques both within our group and in collaboration with other researchers, including fMRI and psychophysics in humans, electrophysiology and imaging in mice and computational modelling.

The lab has an outstanding track record with high impact publications (Nature, Science, Nature Neuroscience, Neuron, PNAS, etc.). The work is funded through 10.2.g

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Attention is a central part of almost all cognitive processes and determines what we see, what we can respond to and what we are able to store in memory. In humans and other primates, attention primarily operates through the selection of visual information and understanding visual attention is therefore of critical importance to understanding a large variety of different brain functions. Our understanding of the deployment of visual attention has made great advances through the use of cognitive neuroscientific techniques in humans such as fMRI, EEG and MEG. These techniques have identified brain networks that appear to be involved in the selection of behaviorally relevant items and the shifting of attention. Unfortunately, these techniques cannot provide cellular resolution of activity and our understanding of the neural circuits that control attention is still incomplete. The studies described here will greatly advance our knowledge of these circuits and the results will inform theories of brain function concerning visual perception, working memory, decision making and cognitive control. We will address central and unresolved questions in cognitive neuroscience about the control of attention and our inability to do two tasks at the same time. Mirroring the broad role of attention in cognition, the study of attention is a broad field involving neuroscientists, cognitive neuroscientists, psychologists and computer vision

attention and working memory ^{10.2.e en 10.2.g} In some versions of the task the stimulus will only be visible briefly so that the information has to be stored in working memory. The animals will give a response after this delay allowing us to study neural activity during the memory retention period. We will record activity through implanted micro-electrode arrays in areas of the visual and possibly frontal cortex to understand how attentional control signals interact with decaying memory traces left behind after a stimulus is removed.

To answer sub-aim #4 we will implant recording chambers over the frontal eye-fields, a cortical region involved in the control of attention and eye movements, and over the superior colliculus, a sub-cortical region which controls eye-movements but which also has wide-ranging projections back to cortical structures. We will simultaneously record neural activity in these structures while the monkeys perform variants of the curve-tracing task to understand how cortical and sub-cortical structure interact to control attention. In each of these sub-aims the changes in neural activity will be related to the monkeys' performance on the tasks. In the experiments of sub-aims #2-#4 we will also perturb activity with microstimulation, pharmacology and/or optogenetics to examine the interactions between these different structures.

These experiments are described in animal procedure 3.4.4.2.

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.

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. These initial stages have been carefully optimized and are performed or overseen 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 the 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 or hand-movements after the presentation of a 'go' cue. At this stage, the animal is ready to be trained on the experimental tasks specific to each sub-aim.

3.4.4.1 Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.

For this sub-aim the animals will be trained to perform various attention demanding tasks. In most of the tasks in the MRI scanner we will use manual-responses (as opposed to eye-movement tasks). The animal must make a hand-movement based on the visually presented stimulus. They will learn tasks in which they attend some of the stimuli and ignore others (as in Figure 1).

We will use Magnetic Resonance Imaging (MRI) to map which brain areas involved in the tasks the monkey is performing. Once an animal has reached adequate performance levels in basic tasks, we will start imaging brain activity. With structural scans, we will gather the detailed anatomical information that is necessary to plan electrode placement and co-register functional data. We will also develop and perform Diffusion Tensor Imaging (DTI) scans to visualize the structural connectivity between areas. These detailed structural scans will largely be performed under anesthesia because they are extremely sensitive to distortions as a result of head motion. Functional scans will also be done with awake,

recording arrays over early visual areas. Electrode arrays contain hundreds of electrodes and allow us to chronically record from the same neurons over a period of more than a year while the monkeys perform the dual-task. To determine how dual-task performance affects activity in attentional control centers we will also implant a custom-designed recording chamber over the frontal eye fields at a later stage. The recording chamber contains a craniotomy, which allows access to the brain for metal micro-electrodes. We will record activity from single-cells in the frontal eye fields while the monkey performs the dual-task.

To answer sub-aim #3 we will train the monkey to perform tasks that require working memory and attention shifts. Multiple stimuli, which the monkey has to remember, will be flashed briefly on the screen. After a delay period a cue is given indicating which of the stimuli is relevant. The monkey makes his report via an eye- or hand-movement. Once the monkeys have reached sufficiently high levels of performance on this task they will be implanted with multi-electrode recording arrays, as described above, over early visual areas. We will chronically monitor neural activity during performance on the task. In later phases of the project we will record from the frontal cortex using a recording chamber and test the causal involvement of the neurons using microstimulation, optogenetics and pharmacological manipulations.

To answer sub-aim #4 the animals will be trained to perform different variants of attention demanding tasks taxing the relation between attention and eye movements. Once they have reached sufficient levels of performance on these tasks the animals will be implanted with two recording chambers as described above. One will be placed over the frontal eye-fields and the other over the superior colliculus. We will then perform simultaneous recordings of activity from these two areas while the monkeys perform the tasks. To study the interactions between these areas during the task we will apply micro-stimulation through the recording electrodes and use optogenetics and study how this affects activity in the other area and behavioral performance. We will also use the local application of pharmacological drugs to study the involvement of specific neurotransmitters and to locally block neuronal activity.

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.

Each of the experiments described above addresses the control of attentional deployment in different situations. Each experiment utilizes a task that requires attention shifts (for example the curve-tracing task, see Fig. 1) because we wish to understand attentional control in high-level and low-level visual areas, the interactions between lower and higher cortical levels as well as the interactions between the cortex and subcortical structures such as the superior colliculus. We have previously validated these paradigms in several brain areas in macaques and we have demonstrated that similar effects exist in the human brain in a rare opportunity to record neural activity from a visual area from a human patient ^{10.2.e en} ^{10.2.g}. The four sub-aims address different aspects of attention control. The only go/no-go moment present in these experiments is in the application of optogenetics, which is a method that will be developed under another CCD protocol. Only if optogenetics gives the reliable activation and silencing of neurons will it be used in this protocol. The four sub-aims have been chosen to provide a complete understanding of how attention is controlled by cortical and sub-cortical networks and the results of the different experiments will inform each other and guide future research. There are links between the experiments described here and those in our other approved CCD licenses. In the license entitled: "Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry" we will identify the brain regions involved in carrying out visual reward-based tasks using fMRI and then target these regions with electrophysiological recordings and micro-stimulation. There is strong overlap between the mechanisms of identifying and orienting towards task-relevant, rewarding inputs and the control of attention ^{10.2.e en} ^{10.2.g}. We envisage that these experiments will inform each other and may identify a brain network that is co-activated in both tasks. However, there will almost certainly be differences between these networks related to the precise control of attention required in the experiments of this license application. Animals participating in the experiments of the previous license could be suitable candidates for re-use in this project and vice versa (see below, depending on the exact locations of the recording chambers and the level of discomfort experienced by the animals) and may reduce the total number of animals required.

This project also has strong connections to the license: "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind". Under that license we investigate how micro-stimulation of eye-movement control centers may help to organize the artificial percepts induced using the prosthesis. Here

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	Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.
2	Measurements of neural activity in cognitive tasks.
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

performed by the monkey.

The flow of animals through this procedure is as follows:

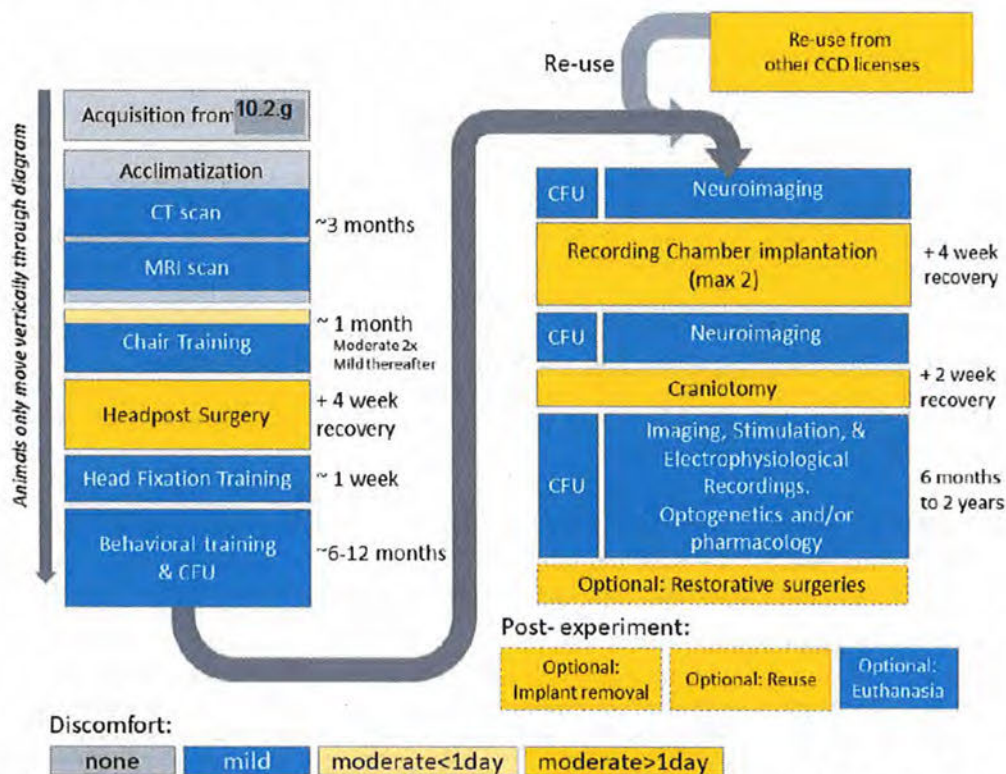


Figure 1 – A flow diagram outlining the steps of procedure 3.4.4.1. The order of the CT and MRI scan may be reversed. CFU refers to periods in which the fluid uptake of the animal is controlled. The procedures to the left are standard procedures that all monkeys in our facility undergo. The procedures to the right are specific to this license. Re-use is conditional on the number and type of implants that the monkey possesses (See section 3.4.3 of main proposal for further details). For the experiments described in this appendix, only animals that possess a fMRI compatible head-post/implants may be reused.

All monkeys involved in this project will be acquired and acclimatized to the primate facility at our institute. They will undergo initial structural anatomical scans to check for obvious brain anomalies and 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 during imaging, stimulation, and neurophysiological recordings. MRI is highly susceptible to movement artefacts, and our behavioural measures require precise measurement of the animal's eye position, which is impossible if the head is moving. The animal will be implanted with an MRI-compatible head-post which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up. 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 lifting a button when a bar on the computer screen changes orientation. 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 bar smaller until the animal can maintain its gaze on the location on a computer screen. The animal is then taught to make eye-movements towards visual targets on the screen. Training will take place in a simulated MRI environment to gradually accustom the animal to performing their task inside a scanner-bore.

After the monkey has reached a sufficient level of performance on these basic tasks, the animal will resume with more complex cognitive tasks, e.g., mentally tracing complex contours. In parallel, the animal will also be slowly habituated to the sound of an MRI-scanner, the handling procedures involved in injecting a contrast agent, wearing ear plugs for protection against MRI-noise, and the MRI recording

minutes. The monkey is then returned to his home-cage, and he is allowed to recover from anesthesia. The total duration of the procedure is approximately 30 minutes. When there are no complications, this procedure will only take place once per animal. Occasionally, in the 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), once per animal (unless complications require re-assessment)

Structural MRI scans are obtained to check whether the brain has any anatomical anomalies, and to localize specific 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. If there are no complications, this procedure will only need to be performed once per animal.

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 head of the monkey is not fixated at this stage. 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 our 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. 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. After this time, the head-post is solidly fixed to the animal's skull.

Head-fixation training

Discomfort: Mild (but decreasing after 1-2 times), approximately 1 week

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 modulated 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. This step usually takes about a week, with the discomfort of the procedure being mild for the first one or two times that the animal is fixated, and lower after this.

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' (5-10 s) 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 2-3 h). Training on the initial tasks takes between 2-6 months depending on the monkey. An example of a training task is to have the monkey direct their gaze to a very small region of a computer screen for 1 s (known as 'fixation'). The difficulty of the task 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

- Averaged over a three-day period, the animals must receive a minimum of 35mg 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, 1-5 times a week

Once the animals have completed their initial training, training will begin on more complex tasks demanding attention shifts. For example, in the curve-tracing task, the animals will be trained to fixate upon a visually presented dot and mentally trace (i.e. without moving their eyes) a complex contour that is connected to the fixation point while ignoring distractor curves. The animal will be trained to either make an eye-movement towards the end of the target curve or make a hand-movement depending on the colour/shape of a target located at the end of the curve. There will also be control conditions in which the animal will perform a different task presented close to the fixation point and ignore the curves. Depending on their complexity, the animals are expected to learn new tasks in 1-6 months.

In practice, scanning sessions in which BOLD signals are measured will usually be done no more than 4 times a week (due to scanner availability). Scanning sessions in which CBV signals (higher signal-to-noise-ratio than BOLD) are measured by use of the injection of an iron-oxide contrast-agent (maximally 12 mg/kg) will preferably be clustered in 3-7 consecutive days, followed by at least 7 days in which no contrast-agent is given. This is because the half-life of the contrast agent in monkeys is approximately 15h. Consequently, the required dosage for injection becomes progressively lower when we image on consecutive days. Due to this accumulation, we will also inject the animals with an iron chelating agent afterwards (4-6 days) to help reduce plasma iron levels back to normal. Electrophysiological recording sessions can be performed in the training set-up (no MRI scanner needed), which is available 1-5 days a week.

It is difficult to precisely estimate the relative frequencies of training sessions, BOLD-imaging sessions, CBV-imaging sessions, and electrophysiological recording sessions, because this will depend on animal performance, scanner availability, and initial results. As a general guide, we can say that we will start a scanning project with BOLD-imaging sessions to get some initial results and verify whether everything works as planned. If initial results, animal performance, and scanner availability allow it, we will perform sets of CBV-imaging sessions (as described above) to obtain higher quality data. Due to its higher signal-to-noise-ratio, we estimate that CBV-imaging allows roughly a threefold reduction in the number of imaging sessions compared to BOLD-imaging. The total duration of the recording sessions will be between 6 months to 4 years.

Microstimulation

Discomfort: Mild

The microstimulation sessions follow an identical format to a behavioural training session. Microstimulation does not cause any discomfort. The animals will perform the same tasks as outlined above, except that the activity of a small group of neurons will be altered with microstimulation.

Pharmacological interventions

Discomfort: Mild

Pharmacological agents will be applied locally to neural tissue through the implanted recording chamber. A sharp glass pipette or combined electrode/pipette will be lowered across the dura in the same manner as a recording electrode. The pharmacological agent will either be slowly injected using pressure, or applied using iontophoresis. The approach used will depend upon the properties of the drug to be applied and the desired volume of the effect, iontophoresis produces a more local effect whereas pressure injections can affect larger volumes. For pressure injections the pipette will be connected to a small-volume syringe and a small quantity (<100nL) of drug will be slowly injected over the course of 5-10 minutes, we have successfully applied this approach in previous studies [10.2.e en 10.2.g](#). For iontophoresis a small wire will be introduced into the glass barrel of the pipette. A holding current is applied to the wire to retain the drug within the barrel. To eject the drug the current is switched in polarity and the charged particles of the drug are driven into the neural tissue. We have successfully used this approach in our previous studies of working memory (Vartak et al., in preparation). We will monitor the effect of the drug on neural activity through a recording electrode in an identical manner to that described above.

Optogenetics

Discomfort: Mild

Optogenetics allows control of neural activity on a very fine temporal and spatial scale compared to microstimulation or pharmacological approaches. We are currently developing optogenetic approaches in primates in a DEC license and a CCD application describing these experiments is currently under consideration. The application of optogenetics in this license is dependent upon achieving successful results in the other CCD license (go/no-go moment, see section 3.4.3 of the main proposal for further details).

There are two possible approaches to achieve optogenetic control:

- 1) Small-scale optogenetics with an optrode.

In this approach a combined recording-electrode/optic-fibre ('optrode') is acutely lowered into the neural tissue through the recording chamber in the same manner as described above. The optic-fibre is connected to a laser light-source and the light exits the optrode close to the recording surface of the electrode. We can then simultaneously record neural activity and apply light. This produces a local effect

Artificial Dura 'refresh' operation

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)

In recording chambers with ADs, 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 (head-post 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 during the course of these procedures. With the maximum possible number of two recording chambers and a headpost this could result in maximally 6 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 or euthanized 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. It may also be possible to send animals to a primate refuge (see NCad advice "Rehoming of former laboratory animals"). In these cases, the implants are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia. Recording chambers and head-posts can usually be removed in a single procedure. The skin is re-sutured over the location of the implant and in our experience the animals recover fully from the procedure.

Perfusion

Discomfort: Mild or none

If histological analysis needs to be performed to verify the location of electrodes, then the monkey will be euthanized at the end of the experiment. The animals are euthanized by an overdose of barbiturates. In cases where the brain will be used for further anatomical or histological studies, the monkeys are cardially perfused with fixative.

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/urine 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.

References

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

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

These experiments investigate the role of different brain regions in controlling attention. In neurophysiological primate research, the absolute minimum number of animals that can be used to check for consistency across animals is two, which is also the broadly accepted norm. Statistics in such studies

instance on a Utah array). This is a level of detail that is inaccessible to fMRI. Human neuroimaging studies generally include 10-20 participants that are scanned once or twice. Monkey neuroimaging studies, on the other hand, usually report results from between 2 and 5 animals that are each scanned numerous times to obtain reliable results (Ortiz-Rios, et al. 2017; Sliwa & Freiwald, 2017; Chau, et al. 2015; Petkov et al., 2015). Even though the novelty of our study makes it difficult to predict variability and effect sizes, we estimate that we will be able to obtain reliable results with three animals.

In addition, it could still be possible that results from these animals is contradictory, or that ethical considerations (humane endpoint) require euthanizing an animal. In such cases, the acquisition of data from an additional animal (four in total) may be required. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 electrophysiology projects an additional monkey was required (i.e. 22% chance of extra monkey being required per project). It remains difficult to estimate whether these odds will be similar for neuroimaging studies, but we have no a priori reason to expect them to be any different. Any acquisition of additional animals up to two extra beyond the initial three will be performed in consultation with the institute's Animal Welfare Body (IvD).

This research project thus requires a minimum of 3 animals with the possible addition of another animal in the case of inconsistent results or problems with one of the 'original' animals. Moreover, 2 animals are already involved in a similar project under a previous license (see section 3.4.3 of the project proposal). They are included in the total number of animals requested here. After a license for this project has been obtained, all proposed experiments will formally be executed under the new license. This animal will then be transferred to this license and new study protocols will be submitted to the IvD.

References

- Chau BKH, Sallet J, Papageorgiou GK, Noonan MP, Bell AH, Walton ME, & Rushworth MFS. (2015). Contrasting Roles for Orbitofrontal Cortex and Amygdala in Credit Assignment and Learning in Macaques. *Neuron*, 87(5), 1106–1118.
- Ortiz-Rios M, Azevedo FAC, Kuśmierk P, Balla DZ, Munk MH, Keliris GA, et al. (2017). Widespread and Opponent fMRI Signals Represent Sound Location in Macaque Auditory Cortex. *Neuron*, 93(4), 971–983.e4.
- Petkov CI, Kikuchi Y, Milne AE, Mishkin M, Rauschecker JP, & Logothetis NK (2015). Different forms of effective connectivity in primate frontotemporal pathways. *Nature Communications*, 6, 6000.
- Sliwa J, & Freiwald WA (2017). A dedicated network for social interaction processing in the primate brain. *Science*, 356(6339), 745–749.

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

Once an animal is implanted with MRI-compatible implants, it can participate in neuroimaging projects in later experiments. After the experiments of this procedure, the animals can be retrained to perform additional cognitive tasks. In addition, it may sometimes be possible to transfer an animal to another CCD project where either existing implants are continued to be used, or it might receive additional implants. In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives no more than two intracranial implants and has not undergone serious discomfort (this has not occurred in the past 5 years). This means, for instance, that if a monkey has already been implanted with the maximum number of two recording chambers in this project, it will not receive any additional implants. 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.

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

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 important step towards understanding how the deployment of attention is controlled by the brain. The applicants are very familiar with the research literature and the present set of experiments are ground-breaking and have not been performed previously. The research described here 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.

Their fluid uptake 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: There is a rare 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.

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.

6. 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.

7. 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.

8. 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, or reduction in activity level), we will notify the IvD and evaluate the animal together with the veterinarian. 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 in 2 consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment 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 (initial)

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 (but decreasing after 1-2 times)

Behavioural training on basic tasks

Discomfort: Mild

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.

(2) Surgical procedures are followed by a minimum of four weeks of recovery. In practice, the interval between successive surgeries is a few months, ensuring that the monkeys have fully recovered after the surgeries before any further interventions take place.

(3) 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.

(4) 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.

The (cumulative) discomfort level classification 'moderate' is also in accordance with (a) the opinion of our vets, who have ample experience with experiments in monkeys and rate the cumulative discomfort as moderate, (b) 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, (c) the opinion of the IvD and (d) 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. Even though this is unlikely, 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, thereby excluding the possibility of severe cumulative discomfort.

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.

In principle, it is not necessary to euthanize the animals in relation to the described experiments. After the experiments, it may be possible for the animals to continue living as normal in their home cage or at a primate refuge. In these cases, the surgical implants are removed in a further operation. It is also possible that animals could be reused in other studies (see section C. Re-use).

In rare cases, it may be necessary to euthanize the animal to verify the location of the electrodes using histological techniques. In these cases, the animal will be euthanized by an overdose of barbiturates followed by perfusion with a fixative.

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

tasks. Once trained on these tasks the animals will be implanted with arrays of microelectrodes, and/or recording chambers targeting different brain regions. After recovery from the implantation, we will then begin electrophysiological experiments in which we record neural activity from the electrodes while the monkey performs the task.

The flow of animals through this animal procedure is described in the figure below:

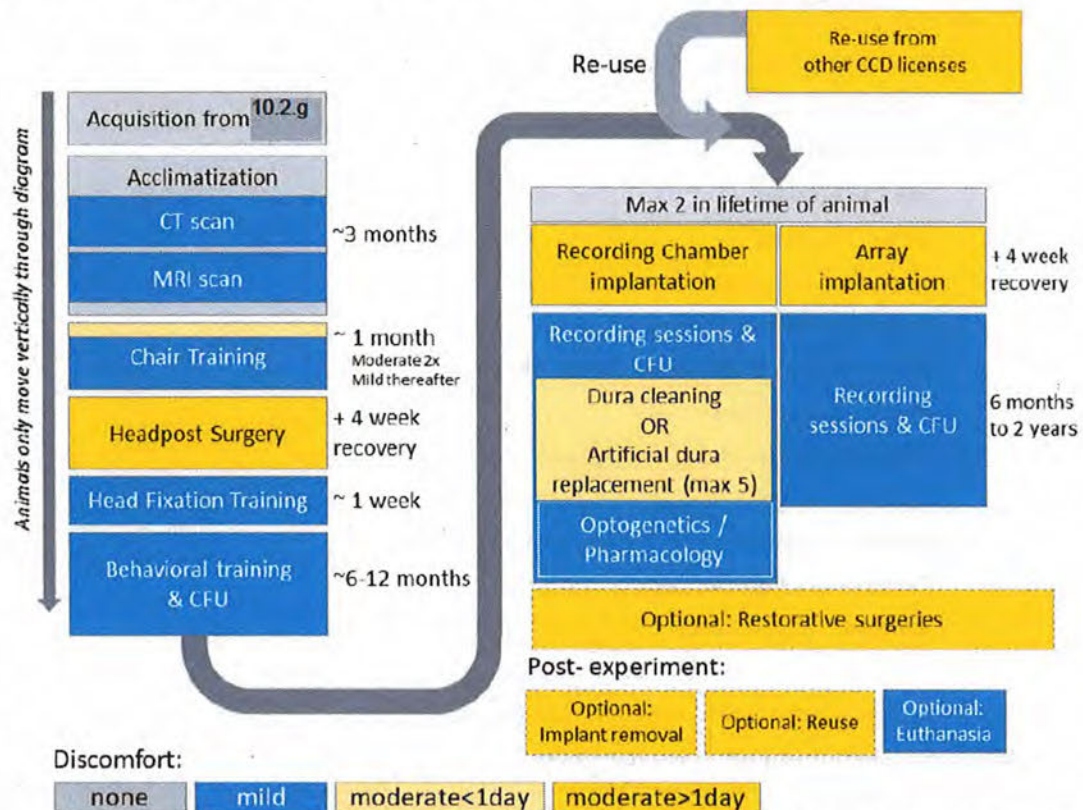


Figure 1 – A flow diagram outlining the steps of procedure 3.4.4.2. The order of the CT and MRI scan may be reversed. CFU refers to periods in which the fluid uptake of the animal is controlled. The procedures to the left are standard procedures that all monkeys in our facility undergo. The procedures to the right are specific to this license. Animals may receive a maximum of 2 implants in their lifetime (recording chambers and/or electrode arrays). Removal of tissue above the dura (dura cleaning) or Artificial Dura replacement will only occur if the animal receives a recording chamber. Optogenetic and pharmacological approaches will only be used in animals with recording chambers. Re-use is conditional upon the number of implants the animal possesses and the total cumulative discomfort (see section 3.4.3. of the main proposal for further details).

It is also possible that animals which have already taken part in the experiments of other CCD approved licenses will be transferred to this protocol. These animals will already have received an intracranial implant as part of the procedures outlined in the other protocol. The term 'intra-cranial implant' refers to the following:

- 1) A set of micro-electrode arrays attached to a connector on the skull. The implanted electrodes can be used for the recording of electrical neuronal activity (spiking and EEG) as well as microstimulation, where the activity of neurons is increased with weak electrical pulses.
- 2) A recording chamber. This recording chamber will be used with electrodes for neurophysiological recording and microstimulation, and also gives access to the brain region of interest for pharmacological and optogenetic experiments.

In the majority of animals, no further intracranial implants will be necessary and the animals will only undergo the behavioural training described below. In some cases, and only if necessary for the aims of this procedure, the animal will receive further intracranial implants with the condition that an individual

Implants

After the monkeys have reached high levels of performance on the complex tasks they will undergo operations to implant a maximum of two of the following intracranial implants.

- A set of 2D Electrode arrays in the cortex (e.g. area V1 and/or V4) plus connector(s).
- A set of Laminar (i.e. 3D) electrode arrays in cortical area plus connector(s).
- A recording chamber for accessing deeper structures and for the local perturbation of neuronal activity by optogenetics and pharmacology.

The choice of implant type depends upon the area that is being targeted. Cortical regions on the surface of the brain, such as V1 and V4, can be targeted by 2D or 3D arrays, whereas cortical or sub-cortical areas which are deeper in the brain, such as the frontal eye-fields or the superior colliculus, will be targeted through recording chambers. If an animal receives more than one intracranial implant, these will be implanted in separate operations, with a long period in between. Typically, these operations would be more than 6 months apart, with a minimum of at least 2 months. An individual animal can receive a maximum of one head-post and two intracranial implants in its lifetime.

Surgery: Electrode array and laminar array implantation

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

The surgical procedure for 2D electrode arrays and 3D laminar arrays is identical. Once the animals have reached a sufficient level of performance on the behavioural tasks they are implanted with arrays of micro-electrodes under general anaesthesia with appropriate analgesia and drugs to reduce brain swelling. After induction of anaesthesia, an incision in the skin will expose the skull. The connectors which are used to make an electrical connection with the microelectrodes are first attached to the skull. A craniotomy over cortical regions will then be performed. The dura mater will be incised and reflected to allow for the insertion of the micro-arrays. Thereafter, the dura mater will be put back in place and sutured, as will be the bone flap that was removed during the craniotomy. The skin will then be sutured shut. The total duration of the procedure is approximately 6-9 hours. Once the incision has healed, only the small connectors from the arrays are exposed. Hence the long-term risk of infection and discomfort is minimal. The animal will be given a one-month recuperation period after this surgery before the commencement of training and recordings.

In some cases, we may split this surgery into two separate surgeries. In the first surgery a 3D printed, custom-designed 'baseplate' is implanted containing fixation points for the array connectors (see Figure 2 below). In a second surgery at least 4 weeks later, the arrays are implanted and the connectors are simply attached to the baseplate. This approach has the advantage of reducing the overall time for the implantation surgery and providing a very stable attachment of the connectors to the skull, decreasing the probability of implant failure.

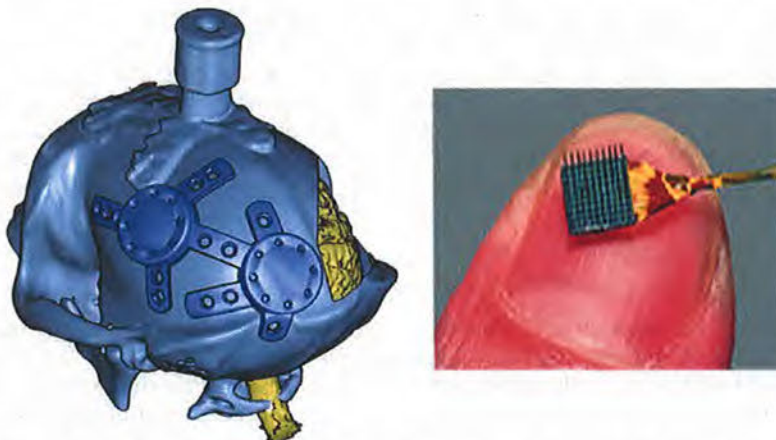


Figure 2. Baseplate and head-post. The image to the left shows a 3D reconstruction of the skull (viewed from the left/rear) from a CT scan of a monkey who had been implanted with a head-post several months prior to the CT. The head-post had become very well integrated into the skull, bone-growth over the legs of the head-post is clearly visible in the CT scan. The blue structure is a 3D model

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, but the tissue damage imposed by the procedure is typically minimal. 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 are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia. Electrode arrays are left in situ, but the connectors are removed. Recording chambers and head-posts are removed. The skin is resutured over the location of the implant and in our experience the animals recover fully from the procedure.

Perfusion

Discomfort: Mild or none

If histological analysis needs to be performed to verify the location of electrodes, then the monkey will be euthanized at the end of the experiment. The animals are euthanized by an overdose of barbiturates. In cases where the brain will be used for further anatomical or histological studies, the monkeys are cardially perfused with 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 implant a large number of electrodes 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 the behavioural task), or ambiguous results may require measurements in a third animal. In such cases, we will apply to the 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 years or older. The main aim of this application is to understand how visuospatial attention is controlled by the brain and the impact of attentional deployment on activity in lower visual areas. This approach requires a species with comparable neuroanatomy to the human and the ability to perform attentional tasks. Rodents are able to perform some simple cognitive tasks, however there are critical differences between the functioning of the rodent and primate visual system which makes rodents unsuitable for this study. Primates have a region of their retina with extremely high spatial resolution known as the fovea which is used for all detailed daytime vision. Primates constantly (3 times per second) make saccadic eye-movements so that the fovea of each eye are pointed at interesting regions of the visual scene. The mechanisms of visual attention are closely related to the mechanisms of eye-movement control and attention can be viewed as a 'pre-selection' of an object to plan an upcoming eye-movement. Importantly primates are able to withhold the actual eye-movement allowing them to covertly attend a particular object while keeping their eyes fixated on a different object. In rodents the control of the eyes is very different. The rodent retina is broadly speaking uniformly sensitive, they have no fovea. This means there is no need to move the eyes to fixate particular regions in the visual scene. Rodents very rarely make eye-movements and if they do these appear to be related to changes in arousal state. It appears therefore that rodents lack a mechanism for visuospatial attention making it impossible to study this process in these species. Cats and ferrets have also often been used in basic visual studies, but these animals cannot be trained to

further surgical interventions. In some cases, it may be possible to further implant an animal with an extra set of arrays or a recording 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 intracranial implants during its lifetime, in addition to a head-post. Re-use is greatly preferable to the acquisition and training of a new animal as it leads to a reduction in the total number of animals and the total number of surgeries.

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

The main aim of this application is to understand how the brain controls the deployment of attention in cognitive tasks. Many studies have approached this question by using cognitive neuroscientific techniques in humans. These studies have provided valuable information about the brain areas which are involved in allocating attention and have led to a number of proposed models about the neural mechanisms of attentional deployment. Unfortunately, the temporal resolution of fMRI is not sufficient to track activity in cognitive tasks and the spatial resolution of EEG/MEG is not sufficient to localize the neural activity to particular brain regions. To fully understand the neural mechanisms that engage and shift attention we need a technique with both high temporal and spatial resolution such as invasive electrophysiological recordings. Invasive recordings can only rarely be performed in humans, typically in surgical investigations of epileptic patients who are implanted with depth electrodes to localize the source of the epileptic activity. In these studies, the location of the electrodes is based purely on clinical criteria, and they are very rarely placed in areas involved in attentional control such as the FEF or parietal cortex. This makes it impossible to collect sufficient neural data to gain an understanding of the underlying neural mechanisms. It is therefore not possible to replace the experiments described here with experiments in humans. It is also impossible to replace the monkeys in these experiments with rodent models or cats for the reasons outlined above in section B. Briefly, rodents and cats are unable to perform the covert attention tasks which are essential to understanding the mechanisms of attentional deployment. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.

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. We reduce the total number of animals used by training individual animals on multiple tasks so that the data from a single animal contributes to multiple research questions. Furthermore, if possible, we can implant further electrodes/chambers in the other hemisphere after recordings are no longer possible from the original electrodes. This allows us to increase the total number of recordings made and to collect behavioural data on multiple research questions. 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 maximally 7 animals to answer our research questions, we expect that approximately 3-4 will come from other experiments. Please see the flow-chart in Figure 1 for further details. Several of the techniques described below under 'refinement' also contribute to a reduction in animal numbers as they improve the stability of implants allowing sampling of more data so that, if possible, the research question can be answered using data from only two animals.

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 neural interfaces) are custom-designed to the anatomy of individual animals, 3D printed, and coated with biocompatible material that promotes bone growth, enhancing the integration of implants with the skull. Fifth, animals are housed socially in an

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 and produce no more than moderate discomfort. In the case of persistent neurological symptoms, or the possibility that the animal will experience more than moderate discomfort, 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

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: Electrode array and laminar array implantation

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

Surgery: Recording chamber implantation and craniotomy

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

Recording sessions

Discomfort: Mild

Removing tissue above the dura

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)

Surgery: Restorative surgeries

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).

Surgery: Implant removal

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

Perfusion

Discomfort: Mild

Annual health check

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)

Cumulative discomfort

The monkeys will undergo surgical procedures, which lead to discomfort at the lower end of moderate that is mostly associated with the recovery from anaesthesia and lasts a maximum period of 1-2 days. Previous research indicated that there is no indication that successive procedures cause cumulative suffering that is more than that caused by the individual procedures and that there is no increase in discomfort through incomplete recovery between events ('stacking') or potentiation of adverse effects and suffering by earlier procedures (Pickard, 2013). 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:

(1) 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. To exclude the longer-term ethological and psychological adverse effects on the animals' wellbeing (i.e. not to the animals' medical condition), 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.

(2) Surgical procedures are followed by a minimum of four weeks of recovery. In practice, the interval between successive surgeries is a few months, ensuring that the monkeys have fully recovered after the surgeries before any further interventions take place.

(3) 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.

(4) 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.

The (cumulative) discomfort level classification 'moderate' is also in accordance with (a) the opinion of our vets, who have ample experience with experiments in monkeys and rate the cumulative discomfort as moderate, (b) we inspected the retrospective assessments of the discomfort experienced by monkeys

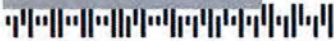


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVC10.2.g 20173789
Bijlagen
2

Datum 2 november 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 november 2017. Het gaat om uw project "Understanding the brain's attentional control systems.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVC10.2.g 20173789. 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.

Datum:
2 november 2017
Aanvraagnummer:
AVC 10.2.g 20173789

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:

10.2.g

Naam instelling of organisatie:

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

10.2.e en 10.2.g

Postbus:

10.2.g

Postcode en plaats:

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:

E-mailadres:

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:

E-mailadres:



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g

10.2.e

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
AVD10.2.g20173789
Bijlagen
2

Datum 2 november 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 november 2017

Vervaldatum: 2 december 2017

Factuurnummer: 173789

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD10.2.g20173789	€ 1.287,00

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
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
E-mailadres

Dhr. Mw.

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 15 - 12 - 2017

Einddatum 14 - 12 - 2022

3.2 Wat is de titel van het project?

Understanding the brain's attentional control systems.

3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Hersenenmechanismen voor de aansturing van aandacht.

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

Naam DEC
Postadres
E-mailadres

10.2.g

Format DEC-advies AVD 10.2.g 2017 3789

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 10.2.g 2017 3789
2. Titel van het project: Understanding the brain's attentional control systems.
3. Titel van de NTS: Hersenmechanismen voor de aansturing van aandacht.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: 10.2.g
 - telefoonnummer contactpersoon: 10.2.e en 10.2.g
 - e-mailadres contactpersoon: 10.2.g
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 12-10-2017
 - aanvraag compleet: 26-10-2017
 - in vergadering besproken: 24-08-2017 en 21-09-2017
 - anderszins behandeld: niet van toepassing
 - termijnonderbreking(en) van 20-10-2017 tot 26-10-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: niet van toepassing
 - aanpassing aanvraag: finale herziene versie ontvangen op 26-10-2017
 - advies aan CCD: 31-10-2017.
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 IvD 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.

ual attention. Unique contributions of our lab include (among others) carrying out research into (1) how attention affects activity in early visual areas and (2) how attention is divided across tasks.

4. As far as the number of animals is concerned, it is unclear to the committee exactly how many spare animals are required to compensate for drop-out. It needs to be clarified that in 22% of the studies with 2 animals a 3rd animal is needed.

Reply: This has been clarified in both appendices.

5. In the NTS the possibility of after lab life is mentioned. Is this a realistic option for the 11 animals. The committee also has the strong impression that after lab life is not feasible in this case and that most, if not all, animals will be killed at the end. Please comment and adjust the text of the NTS when appropriate.

Reply: We are currently investigating the possibilities for after lab-life for the animals in our facility. With the improved 3D printed implants we currently use, it is becoming more feasible to remove the implants and move the monkey to an animal refuge or primate center. We have adjusted the NTS to make it clear that retirement to a refuge/center is a possible option for some animals.

6. How likely is it that this research may contribute to the treatment of psychiatric and/or neuronal afflictions such as ADHD and autism? The link between attentional control and these diseases (and AD) is not well motivated. Is there a formal link with the clinic in relation to this topic?

Reply: The research described here addresses how attention is directed to relevant items and how irrelevant distracters are ignored. In diseases such as ADHD there is a failure of the attentional control systems to filter out distracters and focus on one particular input stream or task. In autism attention may be directed inappropriately, away from salient and social cues. Our research will identify novel brain regions involved in directing attention, it may be possible that these brain areas could be the targets for interventional treatments in the future. The chance of this happening depends upon the location and nature of the area discovered.

It is well established that after an initial amnesic stage in Alzheimer's disease, attention is the first non-memory domain to be affected (Baddeley et al., 1991; MacPherson et al., 2007; Munoz and Everling, 2004; Perry and Hodges, 1999). A better understanding of the functioning of the attentional control circuits is therefore highly relevant for a better understanding of the symptoms of Alzheimer's disease. To give an example, the research will identify the nature of dual-task interference in the brain. This will help us to understand why it is difficult to perform multiple tasks, and perhaps why those suffering from Alzheimer's disease struggle in particular with multi-task situations.

In general, attentional control is a critical factor in almost all cognitive processes and gathering more fundamental knowledge on the mechanisms of this process could have unforeseen benefits in treating many brain disorders.

10.2.e en 10.2.g



7. The DEC would like to understand better why knowledge of attentional control is of scientific interest. In your presentation you were able to make clear that primates are very "visual" animals and that shifting attention and ignoring non-relevant visual information is a crucial basic function of the brain. This urgency should also be clear from the proposal itself.

Reply: We have rewritten the sections on social and scientific relevance (Section 3.3.) to include the aspects discussed during the presentation.

8. What is the connection of this research to the other CCD projects that have been submitted 10.2.e en 10.2.g group? If so; perhaps a short explanation how this knowledge may be helpful (section 3.4.3).

Reply: This project has strong connections to

(a) Experiments of the CCD license "Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry". In that protocol the brain regions involved in carrying out visual reward-based tasks will be identified using fMRI and then these regions will be targeted with electrophysiological recordings and micro-stimulation. There is some overlap between the mechanisms of identifying and orienting towards task-relevant, rewarding inputs and the control of attention 10.2.e en 10.2.g We en-

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-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 begrijpen van de hersenmechanismen waarmee aandacht wordt aangestuurd.**

Aandacht is in belangrijke mate sturend voor ons gedrag maar hoe aandacht en aandachtsverschuivingen tot stand komen is niet goed begrepen. Om dit te onderzoeken zijn specifieke gedragstaken nodig waarbij aandachtsverschuivingen kunnen worden gekoppeld aan activiteitspatronen van de betrokken hersengebieden; visuele taken die aandacht vereisen zijn hiervoor bij uitstek geschikt. Aandacht in de mens wordt in belangrijke mate bepaald door waar we precies naar kijken en het is dan ook niet verwonderlijk dat de hersengebieden betrokken bij aandachtsverschuivingen in belangrijke mate overlappen met de hersengebieden die oogbewegingen aansturen. Het project is een beschrijving van deels al lopend onderzoek in de onderzoeksgroep en de DEC is op de hoogte gebracht van het feit dat op dit moment al enkele resusapen worden gebruikt in het kader van dit onderzoek.

Het onderzoeksproject bestaat uit vier samenhangende onderdelen/subdoelen om verschillende aspecten van dit complexe gedrag te onderzoeken door middel van gedragstaken waarbij aandachtsverschuivingen in verschillende situaties worden gemeten. Het eerste deel van het project is gericht op het nader in kaart brengen van de hersengebieden die betrokken zijn bij aandachtsverschuivingen. Van een beperkt aantal hersengebieden is al bekend dat deze een rol spelen maar naar verwachting zijn er veel meer gebieden betrokken. Ook zal de onderlinge relatie van de neuronale activiteitspatronen van die gebieden worden bepaald. In het tweede deel van het project zal worden bepaald hoe aandacht wordt gestuurd wanneer twee taken in competitie zijn. In het derde deel wordt bepaald wat de interactie is tussen werkgeheugen en aandachtssturing. In het vierde deel wordt de rol van oogbeweging bepaald. Samen dragen de vier subdoelen bij aan het verkrijgen van meer inzichten in de hersenmechanismen die betrokken zijn bij aandacht.

De DEC komt tot de conclusie dat de opbouw van de aanvraag in belangrijke mate overeen komt met voorbeeld 4B van de handreiking 'Invulling definitie project'. De subdoelen worden grotendeels in parallelle studies benaderd en zullen samen leiden tot het bereiken van het hoofddoel. De vier subdoelen van het project zijn elk in voldoende mate uitgewerkt in de beschrijving van de strategie onder 3.4.1 van het voorstel en de onderlinge samenhang van de subdoelen en de type dierproeven in 3.4.3.

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*).

De verkregen fundamentele kennis zal uiteindelijk kunnen bijdragen aan inzichten in de hersenmechanismen waarmee aandacht wordt aangestuurd.

De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en inzicht gegeven in de stand van zaken in de wetenschap. De hersenmechanismen die aandacht sturen zijn grotendeels onbegrepen hoewel de betrokkenheid van een aantal hersengebieden in de mens is vastgesteld met fMRI studies. Deze aanpak bij de mens heeft echter bij lange na niet de benodigde temporele en spatiële resolutie zoals de elektrofysiologische en optogenetische aanpak die beschreven staan in het project om neuronale activiteitspatronen te meten op het niveau van individuele hersencellen en (lokale) populaties van hersencellen om zo tot nieuwe inzichten te kunnen komen. De DEC heeft nadere informatie gevraagd of andere laboratoria vergelijkbare studies doen. De aanvrager geeft aan dat er andere NHP-labs ook aan visuele aandacht werken maar elk gericht op verschillende deelaspecten (zonder verder veel details te noemen). De uniciteit van de groep van de aanvrager is gelegen in onderzoek naar hoe aandacht resulteert in een modulatie van de input in de visuele cortex, hoe aandacht verdeeld moet worden over taken, en welke rol het werkgeheugen hierin speelt. De DEC is er daarom van 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 de nieuwe kennis uiteindelijk zal bijdragen aan een vermeerdering van de inzichten in de hersenmechanismen waarmee aandacht wordt aangestuurd (directe doel) en dat het voorgestelde onderzoek met de voorgestelde aanpak haalbaar is (zie C6 en C7 voor een onderbouwing).

In de DEC is discussie geweest in hoeverre onderzoek naar een tamelijk abstract begrip als (visuele) aandacht relevant is voor de wetenschap en maatschappij. Naar aanleiding van vragen hierover heeft de aanvrager beide aspecten nader uitgewerkt. Aandacht is van groot belang voor vrijwel alle cognitieve processen van de mens en is bepalend voor wat we bewust waarnemen en welke waarnemingen we wegfilteren, waarop we reageren, waarop we handelen en wat we opslaan in ons geheugen. Het is voor de DEC daarmee overtuigend aangetoond dat dit project een cruciaal biologisch proces als onderwerp heeft en dat het wetenschappelijke belang groot is. Wat betreft het maatschappelijk doel: juist omdat aandacht een fundamentele component is van ons functioneren leiden verstoringen in de mechanismen die aandacht tot grote gevolgen. ADHD waarbij de filterfunctie van aandacht niet goed lijkt te werken. Autisme waar aandacht zich lijkt te richten op niet relevante sensorisch input. Reeds in de beginstadia van de ziekte van alzheimer lijkt er een aantasting op te treden van het aandachtsvermogen of aandachts-capaciteit. Ook begrip van de onderliggende mechanismen in meer alledaagse situaties van verdeeld/verkeerd gerichte aandacht zoals ons onvermogen om te kunnen multitasken tijdens verkeersdeelname. De opbrengst van het project kan van belang zijn om door een beter ontwerp van interfaces van bijvoorbeeld complexe medische apparatuur en op die manier onveilige situaties voorkomen. De onderzoekers hebben connecties met cognitiebiologen, psychologen en alzheimer onderzoekers. De belangen voor patiëntengroepen en de maatschappij zijn naar de mening van de DEC aantoonbaar en groot maar zullen pas op lange termijn gerealiseerd kunnen worden. Dit is dan ook primair een fundamenteel-wetenschappelijk project.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebben-

op muizen en ratten en deze techniek wordt binnen een ander CCD project geoptimaliseerd in resusapen.

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

8. 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).*

Het directe doel van het project is *het begrijpen van de hersenmechanismen waarmee aandacht wordt aangestuurd*. Uit het reeds verrichtte onderzoek van de groep is gebleken dat het goed mogelijk is resusapen te trainen op taken die aandachtsverschuivingen betreffen en om informatie in een werkgeheugen te behouden voor uitgestelde oogbewegingen. De eerste resultaten laten zien hoe bij twee competitieve taken die beide aandacht vragen deze in de tijd verdeeld wordt over de twee taken. Dit geeft steun aan de hypothese dat aandacht vragende taken alleen serieel afgehandeld kunnen worden.

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, veel nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden. De keuze van het model en de keuze voor de resusaap als proefdier zijn gerechtvaardigd (zie C9).

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 bezien en er wordt bekeken of de ongeriefsaspecten overeenkomen met het in de aanvraag geschatte ongerief.

Welzijn dieren

9. 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 DEC heeft stilgestaan bij

te voorkomen. De onderzoekers hebben veel ervaring met dit onderzoek en zijn aantoonbaar voortdurend op zoek naar verbeteringen in huisvesting en, verfijningen van de 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; dit is eerder als dilemma genoemd. 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 gevolgd door herstel 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, fretten 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" en classificatie "matig".

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 meer 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 (onvoorzien) 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

gebruik van niet-invasieve methodes bij de mens zal niet resulteren in het behalen van het gestelde doel.

De zeer grote overeenkomsten in gedrag tussen de resusaap en de mens maakt dat het gebruik van deze soort de beste kans biedt op het realiseren van de doelstelling en het verhoogt de kans op een toekomstige translatie naar de mens.

De DEC is tot de conclusie gekomen dat voor het bereiken van de doelstelling de inzet van apen noodzakelijk is en dat de aap (*Macaca mulatta*) de meest geschikte soort is.

- 15.** 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 het project in totaal maximaal 11 dieren nodig zijn. Een aantal van 2 tot 5 dieren per neuroimaging proef (AP 3.4.4.1) is gangbaar binnen in dit wetenschappelijke veld. Het gevraagde aantal van 3 dieren voor dit deel van het project valt daar binnen. Het is niet uit te sluiten dat er zich in de loop van het project omstandigheden voordoen die de inzet van een extra dier noodzakelijk maken.

Een aantal van 2 per subdoel volgens de aanpak zoals beschreven in AP 3.4.4.2 is gangbaar binnen in dit wetenschappelijke veld. De DEC heeft de aanvrager verzocht duidelijker te maken waarom voor elk van de 3 subvragen er 2 dieren nodig zijn en of er geen aanpak denkbaar is waarbij de 3 subvragen in 2 of 4 dieren worden onderzocht. De aanvrager heeft hierover nadere informatie verstrekt (AP 3.4.4.2 – onderdeel B) waaruit blijkt dat dit niet mogelijk is i.v.m. de positie van de afleidkamertjes en dat de gedragstaken voor subdoel 2 en 3 sterk verschillen en erg complex zijn en dat het niet mogelijk is de dieren voor beide taken te trainen. Het aantal dieren is daarmee 6 dieren voor AP 3.4.4.2. Het is niet uit te sluiten dat er zich in de loop van het project omstandigheden voordoen die de inzet van een extra dier noodzakelijk maken.

De criteria voor het gebruik van de maximaal twee extra dieren binnen het project zijn duidelijk beschreven in de aanvraag. De aanvrager heeft de DEC informatie verschaft over de kans dat het gebruik van een extra dier noodzakelijk zal blijken te zijn. Op basis van eigen ervaring wordt die kans op 22% voor een subvraag geschat. De DEC onderschrijft de verwachting dat er een redelijke kans is dat het uiteindelijke aantal dieren op maximaal 11 zal uitkomen. In het geval de noodzaak ontstaat voor meer dan 11 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 de twee extra dieren (1 voor iedere AP) 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 voor het onderzoek van deze onderzoeksgroep als geheel. De DEC heeft dit in een eerder advies als een dilemma gesignaleerd.

- 16.** 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 ge-

[ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing](#)). De DEC wijst erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing uiterst beperkt zijn, dit vereist een extra chirurgische ingreep met matig ongerief als gevolg, en het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie hetgeen 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

20. 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 fundamenteel-wetenschappelijke inzichten in de hersenmechanismen die (visuele) aandacht sturen, het cumulatieve matige ongerief dat maximaal 11 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 meerdere 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 onderzoeksterrein van met name de neurobiologie: *veel voordeel*. Het voorgenomen project zal het inzicht in de neurobiologische mechanismen die aandacht sturen naar verwachting substantieel vergroten. De basale kennisvergroting wordt door de DEC gezien als een *zwaarwegend en groot voordeel*.

Waarden/belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen, *andere wetenschapsgebieden*). De verkregen fundamentele kennis zal op termijn kunnen bijdragen aan verbeterde therapieën voor ziektebeelden waarbij de sturing van de aandacht is verstoord. Een aantal specifieke patiëntengroepen zijn aanwijsbaar. Het is echter niet te

* Een positieve conclusie op een ieder van deze punten ziet de DEC als een noodzakelijke voorwaarde binnen de ethische afweging om te komen tot een positief besluit. Binnen dit project is naar inzicht van de DEC, op basis van alle verstrekte informatie, voldaan

Gezien bovenstaande overwegingen en conclusies is de DEC van opvatting dat het belang van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik en het matig ongerief van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen voor maximaal 11 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 twee extra dieren is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een maximum van 11 dieren. In het geval de noodzaak ontstaat om meer dan 11 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 toepassen van hergebruik, 2) de problematische inschatting van het niveau van cumulatief ongerief (zie onderdeel C11 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 en worden hier herhaald.

1) Tijdens de uitvoering van de proef zullen de dieren nadat de proeven zijn voltooid opnieuw worden gebruikt voor vervolggelaxperimenten waarbij de dieren opnieuw moeten worden geopereerd. De voorwaarden voor het hergebruik zijn helder voor de DEC en IvD en het toezicht op de correcte invulling van het hergebruik zal naar verwachting geen problemen opleveren. Het voordeel van het hergebruik is dat het aantal benodigde dieren binnen de onderzoeksgroep op deze manier met maximaal de helft 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 voor een nieuw dier wordt voorkomen. De DEC volgt de motivering van de aanvragers m.b.t. het gebruik van



Advies aan CCD

B

Datum 01 december 2017

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD20173789

Instelling: 10.2.g
Onderzoeker: 10.2.e en 10.2.g
Project: Understanding the brain's attentional control systems.
Aanvraagnummer: AVD20173789
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	Het Secretariaat heeft de DEC voor de volledigheid gevraagd te beoordelen of de individuele huisvesting en toepassing van waterdeprivatie voldoende is onderbouwd.			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		4	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Mensapen
3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks				
	Rhesusapen (Macaca mulatta)		7	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn Mensapen

Huisvesting anders dan volgens bijlage III van de richtlijn: Individuele huisvesting en waterdeprivatie.

CITAAT.

-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.

-Their fluid uptake will be controlled. The measures we take to reduce adverse

manier onveilige situaties voorkomen. De onderzoekers hebben connecties met cognitiebiologen, psychologen en alzheimer onderzoekers. De belangen voor patiëntengroepen en de maatschappij zijn naar de mening van de DEC aantoonbaar en groot maar zullen pas op lange termijn gerealiseerd kunnen worden. Dit is dan ook primair een fundamenteel-wetenschappelijk project.

-De doelstellingen van het project vallen binnen de voorwaarden die door de Wod aan het gebruik van niet-menselijke primaten worden verbonden. De DEC heeft stilgestaan bij de vraag of de keuze voor de resusaap als proefdier voldoende was onderbouwd en hierover is aanvullende informatie gevraagd. Voor de proeven is het essentieel dat de proefdieren in staat zijn om hun visuele aandacht te verleggen zonder gelijktijdige oog-beweging naar het object van aandacht. Andere diersoorten (honden, katten, varkens, muizen, ratten) die mogelijk 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 dit omdat hun retina uniform gevoelig is. Hierdoor heeft een rat of muis, voor zover bekend, geen neurale circuits die het verleggen van de aandacht koppelen aan een uitgestelde oogbeweging waardoor de meest belangrijke uitleesparameter ontbreekt. Daarnaast wordt het verschuiven van aandacht bij knaagdieren vooral gestuurd aan de hand van multisensorische, tactiele en auditieve prikkels, en in veel mindere door visuele prikkels, en staat daarmee ver af van de sterk visueel gestuurde aandacht in de mens en aap. Katten en fretten hebben weliswaar een vergelijkbare aansturing van de ogen als bij mensen en apen omdat ze frontaal-staande ogen hebben met een duidelijke fovea, maar het is niet mogelijk om deze dieren gedragstaken te leren met aandachtsverschuivingen zonder het maken van directe oogbeweging of om aandachtsverschuivingen te koppelen aan een motorische actie (armbeweging). Elke oogbeweging veroorzaakt een verandering van de visuele input waardoor het onmogelijk wordt de invloed van attentie te isoleren. De ont koppeling van aandachtsverschuiving en directe oogbewegingen lijkt een typische eigenschap te zijn voor prima-ten die ondermeer gerelateerd is aan hun sterk vergrootte frontaalkwab en gespecialiseerde gebieden voor visuele aandacht (waaronder de FEF die de onderzoekers nader bestuderen). De grote overeenkomsten tussen de hersenanatomie van mens en de resusaap is een belangrijk onderdeel om uiteindelijk een translatie naar de mens te kunnen maken. Er bestaan geen alternatieven op basis van (stam)cellijnen of computermodellen. Ook is het niet mogelijk om dit onderzoek in de mens uit te voeren (zie C14).

De DEC komt tot de conclusie dat voor het bereiken van de doelstelling

"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" en classificatie "matig".

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 meer 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 (on-voorziene) 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 vervolgent experimenten 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.

echter niet te verwachten dat op basis van de nieuw verworven kennis op korte termijn nieuwe of verbeterde therapieën kunnen worden opgesteld maar op lange termijn is voordeel mogelijk maar waarvan de omvang op dit moment echter moeilijk in te schatten is. Dit belang is naar opvatting van de DEC daarom van gering gewicht voor de ethische afweging.

3. 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:

o Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename van de neurobiologische inzichten over de hersenmechanismen die (visuele) aandacht sturen. Het is aannemelijk dat deze fundamenteel wetenschappelijk kennis zal bijdragen aan nieuwe inzichten in de oorzaken van bepaalde ziektebeelden in de mens. De DEC beschouwt vergroting van fundamentele kennis op dit onderzoeksterrein als een zwaarwegend belang.

o Er zijn patiëntengroepen te definiëren waarbij een verstoring van de mechanismen die aandacht sturen een rol speelt. Het is het niet de verwachting dat de verkregen inzichten op de korte termijn, d.w.z. binnen de periode van het project, zullen resulteren in nieuwe effectieve behandelingen. Op de lange termijn is dit echter niet uitgesloten; het belang van deze patiënten is daarom slechts in beperkte mate in onze afweging betrokken.

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 C11.

De DEC is 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.

voor vervolgetperimenten maar omdat het ongerief van het individuele dier groter wordt is het ook denkbaar dat het gebruik van meer dieren toch te prefereren is.

2) De inschatting van het cumulatieve ongerief is bij proeven met resusapen van een duur van meerdere jaren is niet eenduidig. Binnen de duur van het experiment zijn er meerdere korte periodes van matig ongerief voornamelijk als gevolg van de chirurgische ingrepen. De ingrepen vinden plaats onder anesthesie en met pijnbestrijding en het matige ongerief wordt daarom voornamelijk veroorzaakt door desoriëntatie na het bijkomen uit de verdoving. Het interval tussen de ingrepen is dusdanig dat de dieren volledig herstellen. De DEC en de aanvrager schatten het cumulatief ongerief in als matig (zoals gemotiveerd in het advies); echter de volledige lijst van alle ingrepen en de langdurige gedragstaken over 4 jaar is dusdanig lang dat de effecten ervan op het dier niet met zekerheid zijn te voorspellen en dat dus niet valt uit te sluiten dat er onder omstandigheden toch ook ernstig cumulatief ongerief kan optreden.

3) De DEC heeft geconstateerd dat na afloop van de proeven beschreven in bijlage 3.4.4.2 er een aantal dieren zal zijn waarvoor geen wetenschappelijke noodzaak bestaat ze te doden. Deze dieren komen voor herplaatsing in aanmerking omdat voldaan lijkt te zijn aan de voorwaarden genoemd in artikel 13d van de Wod (de gezondheidstoestand van het dier herplaatsing toelaat; (b) er geen gevaar bestaat voor de volksgezondheid, de diergezondheid of het milieu; en (c) passende maatregelen genomen zijn om het welzijn van het dier te waarborgen). De verantwoordelijk onderzoeker stelt in de bijlage dat de mogelijkheden zullen worden overwogen om het dier blijvend sociaal te huisvesten binnen het Instituut of het nationale primatencentrum of te herplaatsen in een apenopvangcentrum (zie het NCad advies: Herplaatsing proefdieren). De verantwoordelijkheid rondom de besluitvorming is beschreven in het NCad document en biedt voldoende waarborgen voor een zorgvuldige besluitvorming. In de besluitvorming zal worden betrokken dat herplaatsing een extra chirurgische ingreep vereist en dat het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier. De afweging of dit extra ongerief gerechtvaardigd is t.o.v. de voordelen van herplaatsing zal een dilemma zijn. Verder wijst de DEC erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing in een apenopvang en het nationaal primaten centrum echter beperkt zijn. Dit kan leiden tot het besluit tot doden van een dier hoewel het in principe geschikt is voor herplaatsing. De DEC vraagt aandacht voor dit probleem.

broad role of attention in cognition, the study of attention is a broad field involving neuroscientists, cognitive neuroscientists, psychologists and computer vision researchers and our results will be of great importance in all of these fields.

Social relevance

Attention is a fundamental component of our cognitive capabilities and is important for virtually every cognitive task performed by humans. Studies of 'change blindness' have for example, shown that large, salient objects in a visual scene can be completely missed if attention is directed elsewhere (the most famous example being the 'Gorillas in our midst' video, Simons & Chabris 1999 Perception 28, 1059-1074, <https://www.youtube.com/watch?v=vJG698U2Mvo>). This video shows a dramatic failure of our brains to notice highly salient visual information, revealing the power of attention to filter information out of our awareness. Understanding how our brain determines the focus of attention, and how unattended information is removed from awareness has obvious critical applications in traffic safety, and we have close links with the traffic safety research teams at a Dutch university. Understanding how our attention is captured also of importance when considering tasks which involve screening large amounts of data to check for irregularities (e.g. radiographers, histologists, airport security personnel). A greater understanding of the circuitry that directs attention may help us to design better interfaces for these tasks to guide attention to otherwise ignored parts of the image. Furthermore, deficits in attention contribute to the disturbances in several neurological diseases including ADHD, autism spectrum disorders, schizophrenia and Alzheimer's. Improved understanding of the basic functioning of attention in healthy animals will help us to understand what goes wrong in these diseases and may be important for designing future treatments. Our team has a strong collaboration with the psychiatry department of the AMC, which focusses on how impaired attention control contributes to ADHD and obsessive compulsive disorder. Our findings will be communicated to basic scientists, clinicians, clinical researchers, and the general public.

Onderbouwing
wetenschappelijk en
maatschappelijk belang

11.1

Vervanging	
	<p>3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.: CITAAT.</p> <p>The main aim of this application is to understand how the brain controls the deployment of attention in cognitive tasks. Many studies have approached this question by using cognitive neuroscientific techniques in humans. These studies have provided valuable information about the brain areas which are involved in allocating attention and have led to a number of proposed models about the neural mechanisms of attentional deployment. Unfortunately, the temporal resolution of fMRI is not sufficient to track activity in cognitive tasks and the spatial resolution of EEG/MEG is not sufficient to localize the neural activity to particular brain regions. To fully understand the neural mechanisms that engage and shift attention we need a technique with both high temporal and spatial resolution such as invasive electrophysiological recordings. Invasive recordings can only rarely be performed in humans, typically in surgical investigations of epileptic patients who are implanted with depth electrodes to localize the source of the epileptic activity. In these studies, the location of the electrodes is based purely on clinical criteria, and they are very rarely placed in areas involved in attentional control such as the FEF or parietal cortex. This make it impossible to collect sufficient neural data to gain an understanding of the underlying neural mechanisms. It is therefore not possible to replace the experiments described here with experiments in humans. It is also impossible to replace the monkeys in these experiments with rodent models or cats for the reasons outlined above in section B. Briefly, rodents and cats are unable to perform the covert attention tasks which are essential to understanding the mechanisms of attentional deployment. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.</p>
	<p>3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks: Zie 3.4.4.1.</p>

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.: CITAAT.</p> <p>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, we use an antagonist to minimize the discomfort of recovering from anaesthesia. 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.</p>
	<p>3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks: CITAAT.</p> <p>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 neural interfaces) are custom-designed to the anatomy of individual animals, 3D printed, 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.</p>
Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.

Naam proef		
3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.	HEP: 0-5%	<p>CITAAT.</p> <p>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, or reduction in activity level), we will notify the IvD and evaluate the animal together with the veterinarian. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian.</p> <p>In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 10-15% of their weight in 2 consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the veterinarian will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached.</p> <p>If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized.</p>
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	
3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks	HEP: 0-5%	Zie 3.4.4.1.
Rhesusapen (Macaca mulatta)	Ongerief: 100,0% Matig	

5 Samenvatting

11.1

De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over het belang van het onderzoek voor wetenschap en maatschappij en heeft daar aanvullende informatie over opgevraagd. Het Secretariaat begrijpt 11.1

Er is overlap met lopende DEC protocollen: Zes van de aangevraagde dieren zijn momenteel al ingezet in een proef. ^{11.1}

Vanwege het gebruik van non-humane primaten is een beoordeling achteraf vereist.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

11.1

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IVD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: 10.2.g
Cc: 10.2.e en 10.2.g
Onderwerp: Aanhouden 10.2.g 20173789
Datum: maandag 11 december 2017 10:49:03

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Op 01-11-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the brain's attentional control systems." met aanvraagnummer AVD^{10.2.g} 20173789. 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

De NTS is langer dan 500 woorden. Daarnaast bevat de NTS termen die niet goed te begrijpen zijn voor de leek. Tot slot geeft u bij 4.3 aan dat de dieren worden getraind via gecontroleerde vochtopname. Er is echter sprake van waterdeprivatie. U wordt verzocht de NTS in te korten, moeilijke termen te verwijderen en verhullend taalgebruik te vermijden.

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

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: [secretariaat DEC](#)
Aan: ["info@zbo-ccd.nl"](mailto:info@zbo-ccd.nl)
Onderwerp: T.a.v. 10.2.g Documenten Aanvraag Vergunning Dierproeven 10.2.g 2017 3789 herziene NTS
Datum: maandag 18 december 2017 11:39:52

Beste 10.2.e

Op verzoek van de CCD heeft de aanvrager de NTS aangepast. Ik heb zojuist de NTS en een korte reactie op de vraag van de CCD via WebFTP ingediend.
We hopen snel iets te horen.

14

Groet 10.2.e
en

-----Original Message-----

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: maandag 18 december 2017 11:34

To: secretariaat DEC 10.2.g

Subject: Documenten Aanvraag Vergunning Dierproeven AVD 10.2.g

13

Dit is een automatisch bericht gegenereerd door de SFTP Dienst met betrekking tot een nieuwe aanvraag die is binnengekomen

van: 10.2.g

met de naam: AVD 10.2.g 20173789 In antwoord op vraag NTS .pdf



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project Hersenenmechanismen voor de aansturing van aandacht.
- 1.2 Looptijd van het project 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) Aandacht, cognitie, hersenschors, oogbewegingen, geheugen

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- 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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Aandacht is van fundamenteel belang voor het functioneren van het brein. Wij richten onze aandacht op visuele objecten om ze beter te kunnen zien en om ze vast leggen in ons geheugen. Aandacht is een selectieproces: als we onze aandacht richten op een bepaald object gaat dit ten koste van onze aandacht voor andere objecten. In dit project onderzoeken we hoe en waarom zenuwcellen in verschillende hersengebieden het object selecteren waarop de aandacht wordt gericht en hoe de aandacht wordt verschoven van het ene naar het andere object.
- De hersenenmechanismen die de aandacht sturen zijn grotendeels onbegrepen. Neuroimaging studies in mensen hebben een aantal hersengebieden geïdentificeerd die betrokken zijn bij het richten van de aandacht. Deze studies leveren echter geen informatie over hoe hersencellen in deze gebieden de aandacht sturen. Voor een beter begrip van de aandachtsturing

4.1 **Vervanging**

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

Om de mechanismen van aandacht beter te begrijpen is het belangrijk de activiteit van hersencellen te meten en te beïnvloeden tijdens taken waarbij de aandacht op visuele stimuli dient te worden gericht. De metingen zijn mogelijk door middel van het plaatsen van elektroden in het brein. De activiteit van hersencellen kan bijvoorbeeld worden beïnvloed middels zwakke elektrische stroompjes via de elektroden. Resusapen zijn het meest geschikte proefdier, want zij kunnen aandachtstaken verrichten en ze hebben mechanismen voor aandachtsturing en een hersenstructuur die zeer vergelijkbaar is met die van de mens. Knaagdieren worden niet toegepast in dit onderzoek omdat ze de betreffende aandachtstaken niet kunnen verrichten. Andere dieren, zoals katten of fretten, kunnen hun aandacht niet verschuiven zonder een oogbeweging te maken. Er is voor dit onderzoek daarom geen alternatief voor de resusaap beschikbaar.

4.2 **Vermindering**

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

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 (inclusief de huisvesting van de resusapen) zijn erop gericht om het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Er is veel bekend over de visuele hersenschors in de resusaap en de aap is het enige proefdier dat de aandacht aanstuurt op een manier die voldoende lijkt op de aandachtsturing van de mens.

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.

2) De dieren worden getraind met een restrictieregime waarbij zij de benodigde dagelijkse hoeveelheid vocht als beloning krijgen tijdens de training. We hanteren een zorgvuldig protocol om negatieve effecten van de gecontroleerde vloeistof opname 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.



> 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 20173789

Bijlagen

1

Datum 19 december 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 10.2.e en 10.2.g

Op 1 november 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Understanding the brain's attentional control systems." met aanvraagnummer AVD 10.2.g 20173789. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 december 2017 tot en met 14 december 2022.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) 10.2.g gevoegd. Dit advies is ontvangen op 1 november 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Meer informatie

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

Datum:

19 december 2017

Aanvraagnummer:

10.2.g 20173789

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.



ir. J.F.M. Daemen
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 20173789

of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Ter informatie

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Aanvraagnummer:

AVD10.2.g 20173789

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.

Levensloofdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

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

Van: info@zbo-ccd.nl
Aan: 10.2.g
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag 10.2.g 20173789
Datum: woensdag 27 december 2017 11:05:59

Geachte 10.2.g

Op 01-11-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Understanding the brain's attentional control systems.' met aanvraagnummer AVD^{10.2.g} 20173789.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. de NTS.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

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

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

10.2.e
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

willen we de activiteit van zenuwcellen in de hersengebieden die aandacht sturen in resusapen meten en actief beïnvloeden om te zien welk effect dit heeft op aandachtsturing.

- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Dit onderzoek levert nieuwe inzichten over de wijze waarop zenuwcellen en hersengebieden aandacht sturen. Deze inzichten zijn van groot belang voor onze kennis over de werking van de hersenen omdat denkprocessen sterk afhankelijk zijn van het richten van de aandacht op relevante informatie. De resultaten zijn ook van belang voor een aantal andere terreinen. Stoornissen in de aandachtsturing dragen in belangrijke mate bij aan de symptomen van ADHD, autisme, schizofrenie en de ziekte van Alzheimer. Een beter begrip van de aandachtsturing is daarom van belang bij toekomstige behandelingen voor deze ziekten. Begrip van aandachtsprocessen is ook belangrijk voor de verkeersveiligheid (denk aan het gebruik van smartphones in de auto) en het ontwerp van interfaces tussen mens en machine, zoals bedieningspanelen van complexe medische apparatuur.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Voor dit onderzoek gebruiken we in vijf jaar tijd maximaal 11 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) een aantal dieren ondervindt stress tijdens het transport naar een primaten centrum voor de toediening van vectoren.
- 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 geclassificeerd als licht.
- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?
- Een deel van de dieren kan na afloop van de proef gebruikt worden in andere proeven. Het is mogelijk dat een aantal van de dieren na de proef met pensioen kan. Hergebruik of herplaatsing is afhankelijk van de doelstelling van de specifieke proef. Echter, wanneer we informatie nodig hebben over de precieze locatie van hersencellen wordt de aap onder diepe narcose gebracht en gedood om de hersenen te onderzoeken onder de microscoop.

4 Drie V's

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

Inventaris Wob-verzoek W21-01									
nr.	document NTS20184587	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier, d.d. 16 januari 2018				x		x	x	
2	NTS (versie 1)			x					
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage dierproeven 1				x			x	
5	Ontvangstbevestiging en factuur, d.d. 17 januari 2018				x		x	x	
6	Aanvraagformulier, per post verzonden versie, d.d. 17 januari 2018				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	NTS (versie 2)			x					
9	Projectvoorstel (versie 2)				x		x	x	
10	Bijlage dierproeven 1 (versie 2)				x			x	
11	Interne adviesnota, d.d. 20 maart 2018				x		x	x	x
12	E-mail van CCD aan vergunninghouder - herhaald verzoek om betaling leges, d.d. 20 maart 2018				x		x	x	
13	Interne e-mail van vergunninghouder met verzoek om betaling leges, d.d. 20 maart 2018				x		x	x	
14	E-mail van CCD aan vergunninghouder - vraag over titel aanvraag, d.d. 20 maart 2018			x					
15	E-mail van vergunninghouder aan CCD - reactie op vraag over titel aanvraag, d.d. 21 maart 2018				x		x	x	

16	E-mail van vergunninghouder aan CCD - reactie op herhaald verzoek om betaling leges, d.d. 21 maart 2018				x		x	x	
17	E-mail van vergunninghouder aan CCD - aanvulling op reactie op vraag over titel aanvraag, d.d. 21 maart 2018				x		x	x	
18	E-mail van CCD aan vergunninghouder - reactie op e-mails over titel aanvraag, d.d. 21 maart 2021				x		x	x	
19	E-mail van vergunninghouder aan CCD - bewijs betaling leges, d.d. 26 maart 2018				x		x	x	
20	E-mail van CCD aan vergunninghouder - bevestiging betaling leges, d.d. 26 maart 2018				x		x	x	
21	Interne e-mail CCD - aanbieding van beschikking ter ondertekening, d.d. 27 maart 2018				x		x	x	
22	Interne e-mail CCD - beschikking akkoord, d.d. 27 maart 2018				x		x	x	
23	Interne e-mail CCD - verzoek om verzending beschikking, d.d. 27 maart 2018				x		x	x	
24	Beschikking, d.d. 27 maart 2018				x		x	x	
25	Interne e-mail CCD - bericht over publicatie NTS, d.d. 19 april 2018				x		x		

26	E-mail van CCD aan DEC - terugkoppeling over advisering, d.d. 19 april 2018				x		x	x	
27	E-mail van CCD aan DEC - aanvulling op terugkoppeling over advisering, d.d. 19 april 2018				x		x	x	
28	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 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 checked="" 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.e en 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	
		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
		Functie	10.2.e en 10.2.g
		Afdeling	10.2.e en 10.2.g
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e en 10.2.g
		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 | 1 - 2 - 2018 |
| Einddatum | 31 - 1 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Understanding control of covert attention by the cerebellum.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van de kleine hersenen in de aansturing van aandacht en de connectiviteit met de grote hersenen.
- 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 | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1285 Lege
 Wijziging € 568 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
-

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	
Plaats	10.2.g
Datum	- 1 - 2018
Handtekening	



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- | | |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 Titel van het project | De rol van de kleine hersenen in de aansturing van aandacht en de connectiviteit met de grote hersenen. |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Aandacht, cognitie, cerebellum, oogbewegingen, anatomie |

2 Categorie van het project

- | | |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 In welke categorie valt het project. | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <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>De hoeveelheid informatie die op elk moment via het netvlies binnenkomt in onze hersenen is zo groot dat het onmogelijk is om alle informatie bewust te verwerken. Daarnaast is een groot deel van de informatie niet relevant. Door onze aandacht te verplaatsen en te richten op specifieke delen van het visuele veld kunnen we een selectie maken tussen relevante en irrelevante informatie.</p> <p>Historisch heeft het onderzoek naar visuele aandachtsverplaatsing zich voornamelijk gericht op de werking van de grote hersenen. Echter, recent onderzoek laat zien dat ook de kleine hersenen een belangrijke rol speelt in visuele aandachtsverplaatsing. Zo laten verschillende studies zien dat bepaalde delen van de kleine hersenen actief worden als mensen een visuele aandachtstaak uitvoeren. Deze studies maken gebruik van functionele MRI, een techniek om de activiteit van hersenen bij proefpersonen in beeld te</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

brenge. fMRI is echter te langzaam en mist de precisie om vast te stellen wat de activiteit van individuele zenuwcellen is. Door gebruik te maken van proefdieren, kunnen we wel metingen doen aan individuele cellen. Hierdoor is het mogelijk om een precies begrip te krijgen van de "berekeningen" die de kleine hersenen uitvoeren tijdens het maken van aandachtsverplaatsingen.

De hersenen functioneren als een groot netwerk. Om te begrijpen hoe de hersenen bepaalde taken uitvoeren is het daarom essentieel om de verbindingen tussen individuele cellen te kennen. Door na afloop van de metingen kleurstoffen te injecteren in de kleine hersenen kunnen we de exacte verbindingen met de grote hersenen die een rol spelen in visuele aandachtsverplaatsingen in kaart brengen.

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

Aandacht is een van de hoekstenen van onze denkprocessen en daarmee een essentieel onderdeel van vrijwel elk aspect van menselijk gedrag. Beter begrip over hoe de hersenen aandachtsverplaatsingen sturen draagt bij tot een begrip de rol van een verstoorde aansturing van aandachtsprocessen bij neurologische en psychiatrische aandoeningen, zoals ADHD, autisme, schizofrenie en de ziekte van Alzheimer. Kennis over de normale werking van aandachtsprocessen geeft inzicht in de symptomen van deze ziekten en is daarmee, op langere termijn, van belang bij toekomstige behandelingen voor deze ziekten.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Voor dit onderzoek gebruiken we maximaal 3 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 verschillende 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 belangrijk onderdeel van dit onderzoek is het ophelderen van de verbindingen tussen zenuwcellen die de visuele aandacht sturen in de kleine hersenen. Daarom zullen de apen aan het einde van de proeven gedood worden zodat de zenuwverbindingen bestudeerd kunnen worden 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 proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Studies met niet-invasieve technieken bij mensen verstrekken waardevolle informatie over de hersengebieden die betrokken zijn bij de controle van aandacht. Echter, deze technieken missen de precisie om de activiteit van de zenuwcellen te kunnen bestuderen. Dat gaat slechts door de activiteit van hersencellen te meten met elektroden in het brein. Dit vergt langdurig invasief onderzoek dat niet bij mensen wordt uitgevoerd. Voor dit onderzoek is een geschikte proefdiersoort nodig, met een hersenanatomie die vergelijkbaar is met die van de mens en die aandachtstaken kan uitvoeren. Knaagdieren kunnen enkele eenvoudige cognitieve taken uitvoeren, maar ze hebben geen mechanisme voor het verplaatsen van visuele aandacht, waardoor het onmogelijk is aandachtsprocessen in knaagdieren te

bestuderen. Katten zijn ook vaak gebruikt in studies over het visuele systeem, maar ook zij kunnen niet getraind worden om de aandacht te verschuiven zonder een oogbeweging te maken. Aandachtsprocessen in resusapen lijken op die in de mens en ook de anatomie van de betrokken hersengebieden is vergelijkbaar. Er is daarom bij dit onderzoek geen alternatief voor de resusaap beschikbaar.

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.

4.3 **Verfijning**

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

Alle procedures (inclusief de huisvesting van de resusapen) zijn erop gericht om het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Er is veel bekend over de kleine hersenen van de resusaap en de aap is de enige proefdiersoort die aandacht aanstuurt op een manier die goed overeenkomt met de aandachtsturing van de mens.

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, daar gestreste dieren niet of nauwelijks zullen participeren.

2) De dieren worden getraind met een restrictieregime waarbij zij de benodigde dagelijkse hoeveelheid vocht als beloning krijgen tijdens de training. We hanteren een zorgvuldig protocol om negatieve effecten van de gecontroleerde vloeistof opname 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 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. Het doden van de dieren aan het einde van de proeven vindt plaats onder volledige anesthesie.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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).
- 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 Provide the title of the project. Understanding control of covert attention by the cerebellum.

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.

Outline of the project

With this project we want to increase our understanding on the role of the cerebellum in

cognition, specifically in visual attention shifts. The focus will be on two sub-aims. 1. Deciphering the neuronal computations that take place in individual cells when a non-human primate is performing an attention task. 2. Unravelling the connections that the cerebellum makes to the attention related areas in the cerebral cortex to gain a systems level understanding of the attention network. For this project two, maximally three, rhesus monkeys are required.

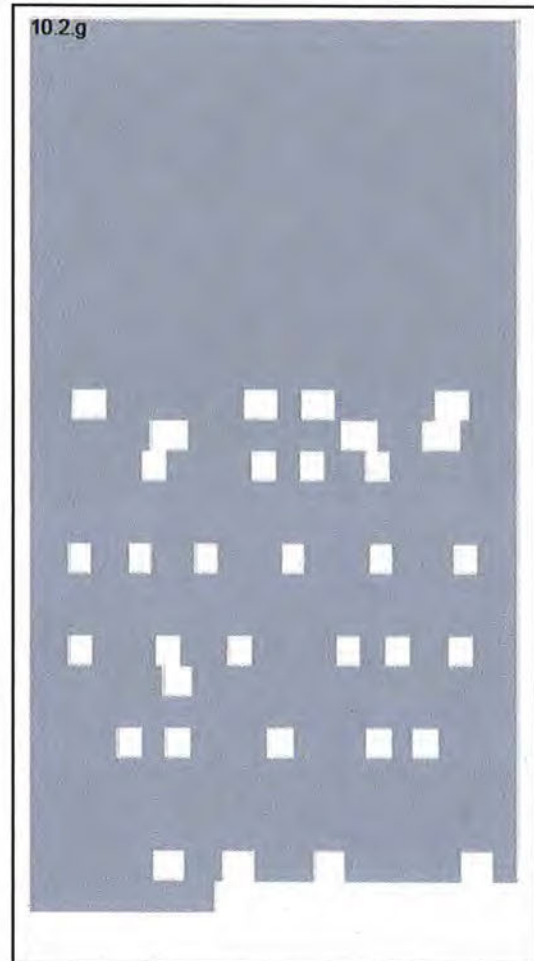
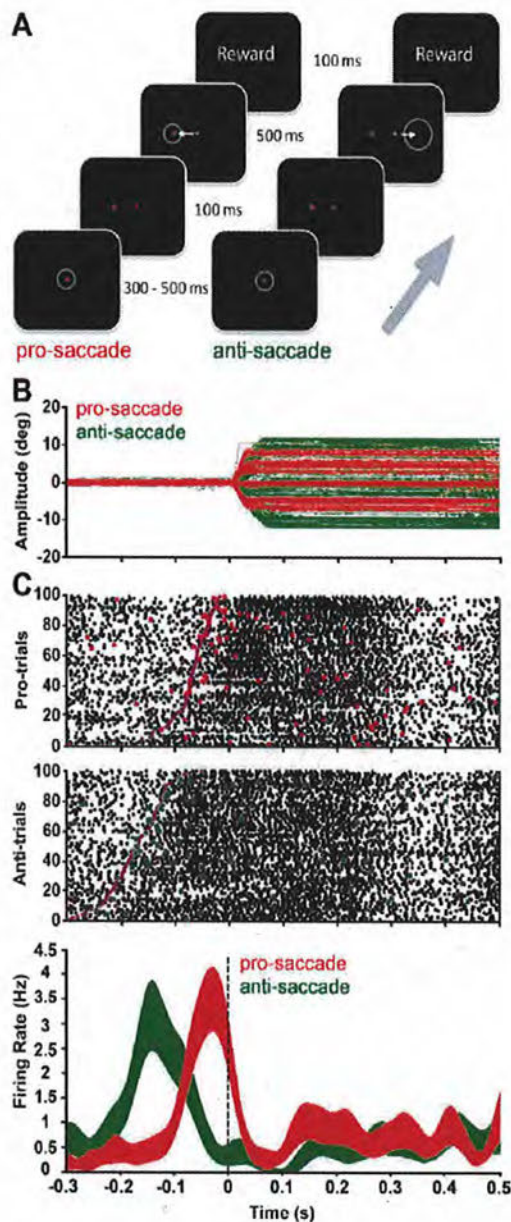
3.1 Background

Introduction: visual attention shifts

For adequate visual perception and visually-guided decision making, it is essential to separate relevant from irrelevant visual information. Our eyes are continuously confronted with an overwhelming amount of information, yet we understand our visual world without any apparent effort. How does the brain parse relevant and discard irrelevant information? Visual attention refers to the cognitive operations that allow us to efficiently perform this selection. Visual attention shifts can be differentiated into overt and covert orienting. Overt orienting refers to the process of moving the eyes to the object of interest. Covert orienting attention on the other hand is the process of mentally shifting attention in the visual field *without* moving the eyes. When making overt attention shifts, the fovea, which is the area of the retina with the highest visual acuity, is moved to an object of interest. The fovea is an extremely small (< 1%) part of the surface area of the retina, thus, a whole world exists outside the scope of the fovea. When shifting attention covertly to stimuli, the visual processing of stimuli outside the fovea is enhanced, giving it more weight in what we experience as a visual percept. Covert attention shifts are faster than overt attention shifts and decrease reaction times for overt attention shifts (Posner, 1980). The social meaning of eye position is a well-studied subject under psychologists. Assessing what a person's intentions; dispositions and beliefs are and even their willingness to initiate a conversation can in some situations all be read from their gaze (Cary, 1978; Emery, 2000; Laidlaw, Rothwell and Kingstone, 2016). Monkeys show similar behavior; like humans they can read many social cues from gaze position and facial expressions, however looking a monkey in the eye is highly threatening for them and can even evoke a fight. This illustrates why it is often advantageous to conceal where one looks, while still extracting scene information by means of covert attention shifts.

Involvement of cerebellum in attention shifts

Understanding how the brain controls attention is one of the challenges of contemporary neuroscience. Most research on this topic focuses on the control of attention by the cerebral cortex. However, recently multiple lines of evidence demonstrate that the cerebellum also plays an important role in the control of covert attention shifts. The idea that the cerebellum does anything other than motor behavior is relatively new (Buckner, 2013) and the involvement of the cerebellum in the deployment of visual attention is a highly understudied field. In our previous research we have shown that the cerebellum contributes to complex decision-making. For example, primates were presented with a visual stimulus and taught to make a saccade to or away from a visual target. Monkeys had to direct their eyes to a red or green visual target in the center of the screen. Based on the color of the visual target they had to decide to either make a saccade to a second, off-center visual target (pro-saccade), or to look in the opposite direction (anti-saccade, fig 1A). During this task activity was recorded from individual cells in the cerebellum, and a marked change in activity occurred during the decision phase just prior to initiating the eye movement (fig 1B,C) [10.2.e en 10.2.g](#). Studies of patients with natural lesions to the cerebellum (e.g. hemorrhage, tumor) have demonstrated impairments in covert attention tasks (Le, Pardo and Hu, 1998; Townsend *et al.*, 1999; Christopher L Striemer *et al.*, 2015). The cerebellum is subdivided into 10 lobules (I-X) and multiple fMRI studies have shown increased activity in the lateral part of lobules VII and VIII of cerebellum when human subjects perform covert attention shifts (Allen, 1997; Tomlinson *et al.*, 2014; C. L. Striemer *et al.*, 2015). Resting state MRI (rsMRI), a proxy for connectivity between brain regions, indicates that these lobules are connected to the **dorsal attention network (DAN, figure 2)**, which controls top-down attention, with both overt (i.e. eye movements) and covert shifts of attention (Corbetta and Shulman, 2002). The cortical areas of the DAN: the frontal eye fields and intraparietal sulcus, are functionally connected to the cerebellum. A



study by Brissenden et al. (2016) elegantly combined fMRI studies with anatomical evidence of connectivity between the DAN and the cerebellum. They measured the fMRI activity of the whole cerebellum during a covert attention task. In another experiment, they measured cerebellar connection strength to DAN with rsMRI. They found a robust linear correlation between cerebellar activity during the attention task and connection strength to the DAN, implying that the cerebellum is an integral part of the dorsal attention network. The limitation of the aforementioned studies is that they do not show how the cerebellum participates in the control of covert attention.

Anatomy of the connections between the DAN and the cerebellum

As famous scientists Crick & Koch stated "In biology, if seeking to understand function, it is usually a good idea to study structure." The cerebellum is massively interconnected with the cerebral cortex. However, little is known about how connectivity between the DAN and the cerebellum is involved in the control of non-motor behavior. With the exception of anatomy based on MRI data there are only a few studies that look at connectivity between the cerebral cortex and cerebellum (Kelly and Strick, 2003; Glickstein, Sultan and Voogd, 2011; Lu, Miyachi and Takada, 2012; Voogd, 2014). Unfortunately, the spatial resolution of MRI based anatomy is inadequate to understand how the areas function as a network. Thus alternative approaches can be used, for example the injection of anatomical tracers which are taken up by neurons. After injection, the tracer is transported through the cell and thereby highlights axonal pathways with single cell resolution. An important advantage of tracing individual cells is that it's possible to inject the dyes exactly where task-related neurons have been found in physiological experiments, thus highlighting unique connections of an area with a specific function. The currently existing neuro-anatomical tracing studies highlight the pathways from the cerebral cortex through the pons to the cerebellum; the cortico-ponto-cerebellar pathway (figure 2). However, there is another extensive input to the cerebellum from the cerebral cortex, through the mesodiencephalic junction (MDJ) in the brainstem; the cortico-mesodiencephalic-cerebellar pathway. This input is well characterized in rodents in relation to motor behavior (10.2.e en 10.2.g), however no studies have been undertaken when it comes to non-motor behavior.

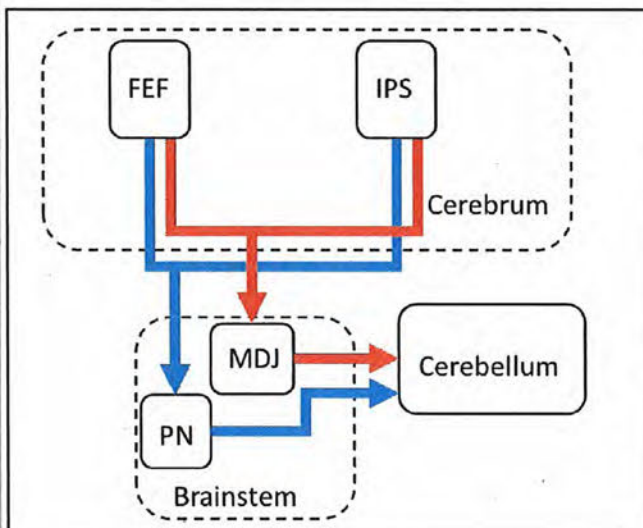


Figure 2. Dorsal attention network with proposed connections between cerebral and cerebellar parts. Blue arrows represent cortico-ponto-cerebellar pathway; orange arrows represent the proposed cortico-mesodiencephalic-cerebellar pathway. Abbreviations: FEF frontal eye fields, IPS intraparietal sulcus, MDJ mesodiencephalic junction, PN pontine nuclei

Open questions on the role of the cerebellum in attention shifts

There is strong evidence that suggests a role for the cerebellum in the control of covert attention shifts. The evidence that exists however is of correlative nature, thus it is necessary to identify if there is causal involvement of the cerebellum during covert attention shifts. Experiments are therefore required to determine the exact nature of cerebellar contributions to attentional shifts and what type of computations are involved. Lastly, it is clear from previous studies that there is strong connectivity between the areas of cerebellum and the cerebral cortex that control attention. These connections are relayed in the brainstem. However, it is unknown which of the specific areas functions as relay between the cerebral DAN and the cerebellum. Therefore, to gain understanding of how the brain control attention as a whole, the exact connectivity between the cerebral and cerebellar areas that control attention needs to be elucidated.

Allen, G. (1997) 'Attentional Activation of the Cerebellum Independent of Motor Involvement', *Science*, 275 (5308), pp. 1940-1943. doi: 10.1126/science.275.5308.1940.

- Bosse, M. L., Tainturier, M. J. and Valdois, S. (2007) 'Developmental dyslexia: The visual attention span deficit hypothesis', *Cognition*, 104(2), pp. 198–230. doi: 10.1016/j.cognition.2006.05.009.
- Brissenden, J. A. et al. (2016) 'Functional Evidence for a Cerebellar Node of the Dorsal Attention Network.', *The Journal of Neuroscience*, 36(22), pp. 6083–6096. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0344-16.2016.
- Buckner, R. L. (2013) 'The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging.', *Neuron*, 80(3), pp. 807–15. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.044.
- Cary, M. S. (1978) 'The Role of Gaze in the Initiation of Conversation Author (s): Mark S . Cary Published by : American Sociological Association', *Social Psychology*, 41(3), pp. 269–271.
- Casco, C., Tressoldi, P. E. and Dellantonio, A. (1998) 'Visual selective attention and reading efficiency are related in children', *Cortex. Elsevier*, 34(4), pp. 531–546. doi: 10.1016/S0010-9452(08)70512-4.
- Corbetta, M. and Shulman, G. L. (2002) 'Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 3(3), pp. 215–229. doi: 10.1038/nrn755.
- Courchesne, E. et al. (1994) 'Impairment in shifting attention in autistic and cerebellar patients', *Behavioral Neuroscience*, 108(5), pp. 848–865. doi: 10.1037/0735-7044.108.5.848.
- Crick, F. C. and Koch, C. (2005) 'What is the function of the claustrum?', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1458), pp. 1271–1279. doi: 10.1098/rstb.2005.1661.
- Emery, N. J. (2000) 'The eyes have it: The neuroethology, function and evolution of social gaze', *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(6), pp. 581–604. doi: 10.1016/S0149-7634(00)00025-7.
- Facoetti, A. et al. (2000) 'Visual-spatial attention in developmental dyslexia', *Cortex. Elsevier*, 36(1), pp. 109–123. doi: 10.1016/S0010-9452(08)70840-2.
- Glickstein, M., Sultan, F. and Voogd, J. (2011) 'Functional localization in the cerebellum', *Cortex*, 47(1), pp. 59–80.
- Ignashchenkova, A. et al. (2004) 'Neuron-specific contribution of the superior colliculus to overt and covert shifts of attention', *Nature Neuroscience*, 7(1), pp. 56–64. doi: 10.1038/nn1169.
- Kelly, R. M. and Strick, P. L. (2003) 'Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(23), pp. 8432–8444. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2323-03.2003 [pii].
- Laidlaw, K. E. W., Rothwell, A. and Kingstone, A. (2016) 'Camouflaged attention: covert attention is critical to social communication in natural settings', *Evolution and Human Behavior*. Elsevier B.V., 37(6), pp. 449–455. doi: 10.1016/j.evolhumbehav.2016.04.004.
- Le, T. H., Pardo, J. V and Hu, X. (1998) '4 T-fMRI study of nonspatial shifting of selective attention: cerebellar and parietal contributions.', *Journal of neurophysiology*, 79(3), pp. 1535–1548.
- Lu, X., Miyachi, S. and Takada, M. (2012) 'Anatomical evidence for the involvement of medial cerebellar output from the interpositus nuclei in cognitive functions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), pp. 18980–18984. doi: 10.1073/pnas.1211168109.
- Maruff, P. et al. (1995) 'Asymmetries in the covert orienting of visual spatial attention in schizophrenia', *Neuropsychologia*, 33(10), pp. 1205–1223. doi: 10.1016/0028-3932(95)00037-4.
- Mathot, S. et al. (2016) 'The mind-writing pupil: A human-computer interface based on decoding of covert attention through pupillometry', *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0148805.
- Moore, D. M. et al. (2017) 'The developmental relationship between specific cognitive domains and grey matter in the cerebellum', *Developmental Cognitive Neuroscience*. Elsevier Ltd, 24, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.dcn.2016.12.001.