

	Inventaris Wob- verzoek W21-04									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS20173789	reeds openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 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						
17	Beschikking, d.d. 19 december 2017				x		x		x	
18	E-mail van CCD aan DEC - Terugkoppeling over DEC-advies				x		x		x	

19	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 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.	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 30%;">Naam instelling of organisatie</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.g</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.g</td></tr><tr><td colspan="2">Straat en huisnummer</td></tr><tr><td colspan="2">Postbus</td></tr><tr><td colspan="2">Postcode en plaats</td></tr><tr><td colspan="2">IBAN</td></tr><tr><td colspan="2">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	10.2.g	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e	KvK-nummer	10.2.g	Straat en huisnummer		Postbus		Postcode en plaats		IBAN		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
Naam instelling of organisatie	10.2.g																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e																	
KvK-nummer	10.2.g																	
Straat en huisnummer																		
Postbus																		
Postcode en plaats																		
IBAN																		
Tenaamstelling van het rekeningnummer																		
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>	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td colspan="2">Straat en huisnummer</td></tr><tr><td colspan="2">Postbus</td></tr><tr><td colspan="2">Postcode en plaats</td></tr><tr><td colspan="2">IBAN</td></tr><tr><td colspan="2">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td></tr></table>	Straat en huisnummer		Postbus		Postcode en plaats		IBAN		Tenaamstelling van het rekeningnummer							
Straat en huisnummer																		
Postbus																		
Postcode en plaats																		
IBAN																		
Tenaamstelling van het rekeningnummer																		
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 30%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e</td><td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e en 10.2.g</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2" style="background-color: #cccccc;"></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2" style="background-color: #cccccc;"></td></tr></table>	(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			
(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.	<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td style="width: 30%;">(Titel) Naam en voorletters</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e</td><td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e en 10.2.g</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td style="background-color: #cccccc;">10.2.e</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td colspan="2" style="background-color: #cccccc;"></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td colspan="2" style="background-color: #cccccc;"></td></tr></table>	(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			
(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																		

- 1.6 (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 | 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 | 10.2.g |
| Postadres | |
| 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.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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



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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.* 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)
- We leven in een complexe wereld waarin we onze aandacht moeten verdelen over vele taken. Hersennetwerken bepalen waarop we onze aandacht richten. De controle van aandacht door deze netwerken is van groot belang en zorgt ervoor dat we ons kunnen concentreren op iets belangrijks maar ook dat we kunnen schakelen en onze aandacht op iets anders richten. Aandacht is te beschouwen als de 'poortwachter' van het geheugen; het selecteert de informatie die we onthouden en negeren de rest. In dit voorstel onderzoeken we *visuele* aandacht. Bij de mens is het zien het dominante zintuig. Verschuiving van visuele aandacht gaat meestal gepaard met oogbewegingen – we richten onze ogen op de informatie die van belang is. Dit gebeurt echter niet altijd; mensen (en apen) zijn ook in staat de aandacht te verschuiven van het ene naar het andere voorwerp terwijl de oogpositie constant blijft. Op die manier kunnen we onze intenties en plannen voor onszelf houden.

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

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 leveren waardevolle informatie op over de hersengebieden die betrokken zijn bij de controle van aandacht. Echter, deze technieken missen de spatiele en temporele resolutie om de activiteit van individuele zenuwcellen te kunnen bestuderen. Dat is alleen mogelijk door de activiteit van deze hersencellen rechtstreeks te meten met elektroden. Incidenteel is dit mogelijk bij epilepsiepatiënten die tijdelijk elektrodes geïmplantiseerd krijgen maar er zijn ons geen studies bekend over de activiteit van hersencellen in gebieden die bij de mens de aandacht controleren. Voor dit onderzoek is een geschikt proefdier nodig dat de aandacht kan verschuiven en een anatomie van de hersenen heeft die vergelijkbaar is met die van de mens. Knaagdieren worden vaak gebruikt voor neurowetenschappelijke studies, maar zij kunnen aandacht niet richten of verschuiven op visuele objecten, waardoor het onmogelijk is deze processen in knaagdieren te bestuderen. Andere dieren, zoals katten of fretten, kunnen niet getraind worden om de aandacht te verschuiven zonder dat zij daarbij een oogbeweging maken. Resusapen kunnen dit wel. Aandachtsprocessen in resusapen lijken op die in de mens en ook de anatomie van de betrokken hersengebieden is vergelijkbaar. 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. Een dergelijk nieuw experiment bestaat veelal uit het trainen van hetzelfde dier voor een andere taak.

4.3 **Verfijning**

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

Alle procedures (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. Dit is ook van belang voor het welzijn van de experimenten omdat gestreste dieren niet of nauwelijks zullen participeren.

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 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.

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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The experiments described in this proposal are designed to further our understanding of how the brain's attentional control centers function and how they interact with early visual areas. We will investigate how attention is allocated to solve cognitive tasks critical to the functioning of the primate brain. The experiments will be performed in 9, and maximally 11,

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-

cortical interactions are specifically affected in many diseases, including Alzheimer's disease and schizophrenia (Argyelan et al., 2014; Sanz-Arigita et al., 2010).

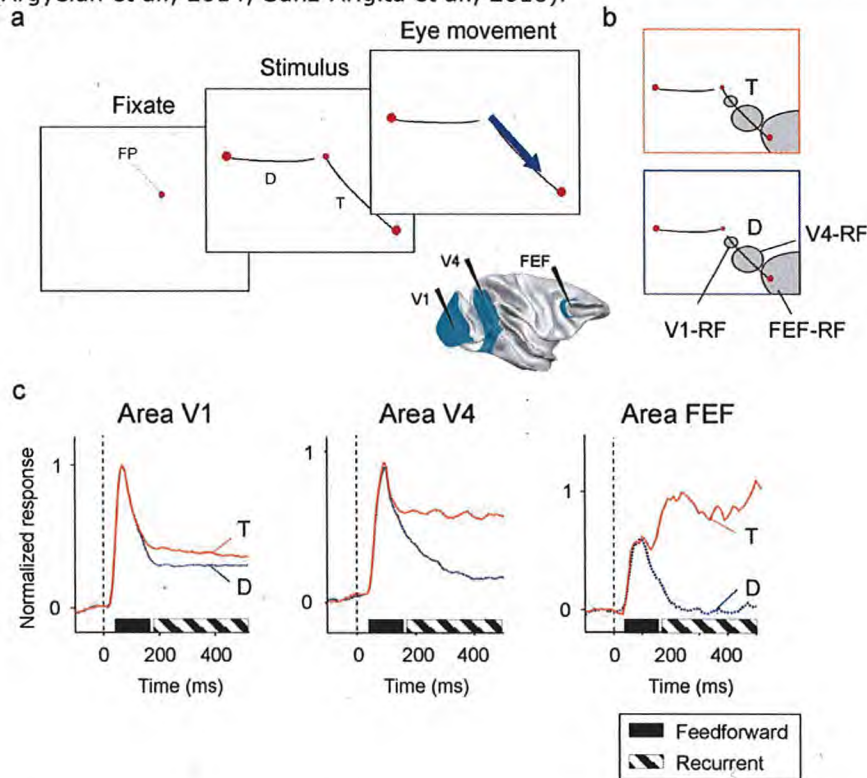


Figure 1. Activity in the visual and frontal cortex in the curve tracing task. (a) A fixation point appears at the start of a trial and once the monkey attains fixation, two curves and two red circles appear on the screen. The monkey's task is to mentally trace the target curve (T) that is connected to the fixation point to determine the location of the larger red circle at the end of the curve. The other curve is a distractor (D). Inset, recordings were made from neurons in the visual cortex (V1 and V4) and frontal cortex (FEF, the frontal eye fields). (b) The receptive fields (RFs) of neurons in areas V1, V4 and FEF fall either on the target curve (upper panel) or on the distractor curve (lower panel). The receptive field is the region in visual space that activates the neurons. (c) Neurons in all areas enhance their activity when the target curve falls in their receptive field (orange responses) compared to when they respond to a distractor (blue responses). The reason for the increase in activity is a shift of attention over the target curve that does not occur for the distractor curve. The initial, feed-forward responses register the appearance of the new visual stimulus before the attention shift (black bar). During this phase, the activity elicited by the target and distractor curve are still the same. The response enhancement due to the attention shift occurs later (striped bar), after a delay of approximately 150 ms.

#2 - Assigning attentional resources in multiple tasks

The ability to multi-task is crucial. Many of us have experienced driving a car while simultaneously following the instructions of a sat-nav device and holding a conversation with a passenger. We are also aware that multi-tasking comes with associated costs, for example in many countries it is illegal to make a phone-call while driving a car as performing multiple-tasks worsens driving ability (Levy et al., 2006). It is as if our brain contains a bottleneck so that it can only process one task at any one time. It is of scientific importance to reveal the nature of this bottleneck because it informs us about a fundamental processing limitation of the human brain. Furthermore, it is of social importance to understand the mechanisms of dual-task impairments as dual-task performance is particularly impaired in Alzheimer's disease (Baddeley et al., 1991; MacPherson et al., 2007) whereas it is unaffected in normal ageing (Anderson et al., 2011).

However, almost all previous studies of attention have used a single-task, for example, attention must be directed towards a single object and a judgment is made about a property of that object. This does not reflect the real-world situation in which multiple tasks compete for attentional resources at any one time.

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.

2014. Resting-state fMRI connectivity impairment in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr. Bull.* 40, 100–10.

Baddeley, A.D., Bressi, S., Della Sala, S., Logie, R., Spinnler, H., 1991. The decline of working memory in Alzheimer's disease. A longitudinal study. *Brain* 114 (Pt 6), 2521–42.

Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K., 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* 8, 1263–8.

Corbetta, M., 1998. Frontoparietal cortical networks for directing attention and the eye to visual locations: identical, independent, or overlapping neural systems? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 831–838.

Corbetta, M., Shulman, G.L., 2011. Spatial Neglect and Attention Networks. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 569–599.

Egeth, H.E., Yantis, S., 1997. Visual attention: Control, resrepresentation and time course 48, 269–297.

Fecteau, J.H., Munoz, D.P., 2006. Saliency, relevance, and firing: a priority map for target selection. *Trends Cogn. Sci.* 10, 382–390.

10.2.e en 10.2.g

Levy, J., Pashler, H., Boer, E., 2006. Central interference in driving: Is there any stopping the psychological refractory period? *Psychol. Sci.* 17, 228–235.

10.2.e en 10.2.g

MacPherson, S.E., Della Sala, S., Logie, R.H., Wilcock, G.K., 2007. Specific AD impairment in concurrent performance of two memory tasks. *Cortex.* 43, 858–65.

Moore, T., Fallah, M., 2004. Microstimulation of the frontal eye field and its effects on covert spatial attention. *J. Neurophysiol.* 91, 152–162.

10.2.e en 10.2.g

Munoz, D.P., Everling, S., 2004. Look away: the anti-saccade task and the voluntary control of eye movement. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 218–228.

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

Rizzolatti, G., Riggio, L., Dascola, I., Umiltà, C., 1987. Reorienting attention across the horizontal and vertical meridians: evidence in favor of a premotor theory of attention. *Neuropsychologia* 25, 31–40.

10.2.e en 10.2.g

Sanz-Arigita, E.J., Schoonheim, M.M., Damoiseaux, J.S., Rombouts, S.A.R.B., Maris, E., Barkhof, F., Scheltens, P., Stam, C.J., 2010. Loss of "Small-World" Networks in Alzheimer's Disease: Graph Analysis of fMRI Resting-State Functional Connectivity. *PLoS One* 5, e13788.

Schall, J.D., Hanes, D.P., Thompson, K.G., King, D.J., 1995. Saccade target selection in frontal eye field of macaque. I. Visual and premovement activation. *J. Neurosci.* 15, 6905–6918.

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

3.2 Purpose

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

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

The main aim of this study is to investigate the neural mechanisms by which the brain controls attention shifts.

During this project we will focus on four sub-aims:

#1) *The brain areas which control attention*

In this aim, we will use attention-demanding tasks to study the deployment of attention including the curve-tracing task. We aim to map out the brain areas involved in shifting attention in this task using functional magnetic resonance imaging of macaque monkeys. Once we have identified the network we will target these areas with micro-electrode recordings to study neural activity at a fine temporal and

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

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, ^{10.2.g}

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. ^{10.2.g}

Our findings will be communicated to basic scientists, clinicians, clinical researchers, and the general public.

3.4 Research strategy

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

General strategy

Each of the four sub-aims described above will be addressed in experiments with macaque monkeys. All monkeys will undergo an acquisition and training procedure as described below which we successfully implement in every monkey that joins the primate facility. The monkey will be trained on visual tasks, each task will involve the visual presentation of a stimulus and will require a response from the animal in the form of an eye or hand movement.

Sub-aim #1

In the experiments addressing this sub-aim we will identify the brain networks involved in attentional control during tasks that demand shifts of attention (such as the curve-tracing task) using fMRI. For our fMRI experiments, we will train the animals to perform hand responses. We will contrast brain activity during task performance to control situations in which the animal maintains attention at the centre of the screen and ignores the stimuli. This contrast will reveal the brain networks involved in performing the tasks. After we have identified the regions of interest with fMRI, we will reveal how this activity is involved in attention by implanting recording chambers over identified brain regions and record neural activity using metal microelectrodes while the animals perform the task. In some of the experiments we will perturb activity with microstimulation and/or optogenetics and examine the influence on the behaviour and on activity at other nodes of the attention control network.

These experiments are described in animal procedure 3.4.4.1.

Sub-aim #2, #3 and #4

The strategy for addressing these sub-aims is very similar. The animals will be trained on different versions of the tasks that require attention shifts, such as curve-tracing or visual search. To answer sub-aim #2 they will be trained on a dual-task paradigm in which they perform both a manual-response task and a saccade-response task with varying delays between them. We will examine how different delays between the two tasks affects neural activity in different areas of the visual and frontal cortex through implanted micro-electrode arrays, which allow chronic recording of neural activity, and recording chambers, which allow acute access to deeper brain structures.

To answer sub-aim #3 the animals will be trained to perform tasks that demand interactions between

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,

behaving animals. We will start with basic visual tasks to validate the imaging results against well-established knowledge of brain function (a high-contrast visual stimulus, for instance, activates visual cortices and subcortical structures involved in visual processing). When the imaging quality is satisfactory, we will move to the more complicated tasks designed to probe the neural networks of attentional control. We expect that this stage of the project will take up to six months.

Functional brain activity can be measured with either the Blood Oxygen Level Derived (BOLD) signal, or with the contrast-enhanced Cerebral Blood Volume (CBV) signal. The two signals measure largely the same thing, but the signal-to-noise-ratio (SNR) of CBV is approximately three times higher than that of BOLD (Vanduffel et al., 2001; Leite et al., 2002; Mandeville, 2012). Unlike BOLD, however, CBV requires an intravenous injection of a contrast agent prior to scanning. We will use a contrast-agent approach whenever suitable to reduce the number of experimental sessions needed to obtain reliable data.

In the next part of the experiment, we will investigate neural activity on a finer scale by recording from cells in the areas identified during the imaging studies using metal microelectrodes. In addition, we will investigate the causative role of these areas in the curve-tracing task by micro-stimulating the identified area, or by pharmacologically inactivating the area, or by using optogenetics. Micro-stimulation involves the delivery of micro-ampere currents through the same electrodes which are used for recording activity. Stimulation briefly disrupts processing in the target area allowing us to determine whether a given area plays a critical role in the curve-tracing task. As the currents involved are very small and brief in duration, this technique does not cause any extra discomfort for the animal. Pharmacological approaches involve the application of a drug which alters neural activity over a time-scale of minutes/hours. After this period the activity returns to normal allowing comparisons of neural activity and behavior prior to, during, and after drug application. By the local application of specific drugs in the structure of interest, the involvement of specific receptors can be studied [10.2.e en 10.2.g](#), and small injections of blockers of neuronal activity can be used to study the causal involvement of neurons in determining an attention shift. Optogenetics is a method allowing control of neural activity on faster time-scales (e.g. milliseconds). In this technique neurons are caused to express light-sensitive proteins known as opsins (Boyden et al., 2005). Opsins allow the membrane potential of neurons to be manipulated by exposure to light. Different opsins allow either excitation or silencing specific circuits which permits the investigation of the normal functioning of these circuits, and their causal role in the control of attention shifts. The expression of opsins requires the injection of viral vectors directly into cortex. These vectors have been modified to carry the gene encoding for the opsin protein while removing the genes necessary for replication of the virus. Once the viral vector infects the cells at the site of the injection, the genes encoding for the opsin protein are expressed and the cells become sensitive to light.

We will design and implant a maximum of two recording/stimulation chambers that will allow acute, or semi-chronic, recording or stimulation/inhibition of the underlying neural tissue. The choice for one or two stimulation chambers depends on the brain areas we plan to record from based on the neuroimaging results. If these areas can be reached from a single chamber we will only implant one. If, however, some areas require a significantly different point or angle of entry into the brain it is possible that they cannot be reached from the same chamber. In such cases, we will implant two chambers. If this requirement is known before the first chamber is implanted, both chambers will be implanted in the same procedure. We will initially leave the cranium intact when we place the recording chamber. We then plan the required electrode trajectory towards the target area and make a craniotomy in the recording chamber. With electrodes in the target area, we can then either stimulate or record through these electrodes, locally apply drugs and inject virus and insert combined recording electrodes/light-guiding fibers (known as 'optrodes') for optogenetics. If light application over a larger spatial scale is required we will replace the native dura with an artificial silicone dura. The artificial dura is transparent to light allowing targeting of laser/LED light sources to broader regions of cortex. Stimulation effects on cognitive behavior can be measured outside of the scanner, whereas neural consequences of stimulation can be obtained using stimulation in conjunction with fMRI or neurophysiological recordings. We will also perform combined stimulation-fMRI without a task to reveal the causal relationship between the target area and other brain areas. Depending on initial results, this part of the project can take anywhere from six months to four years.

3.4.4.2 Measurements of neural activity in cognitive tasks.

To answer sub-aim #2 the animals will be trained to perform a dual-task version of attention-demanding tasks in which they perform a hand-movement and eye-movement in close succession. Once the animals have reached sufficient levels of performance on the task they will be implanted with multi-electrode

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

we will gather information on the interactions between eye-movement control centers during attentional tasks, which may help inform the micro-stimulation experiments.

Some animals may be reused from other appendices or CCD licenses. Re-use is an important aspect of macaque research, the animals are trained for many months and receive implants which can be functional for years. These animals can be retrained very quickly to perform other tasks and in many cases, experiments can be completed without the need for extra surgical procedures. This leads to an overall reduction in the number of animals used as each animal can take part in multiple research questions. Re-use is conditional on the monkeys not receiving more than 2 implants plus a head-post in the lifetime of the animal (see table below) and that the cumulative discomfort can never be more than moderate.

Which implants does the animal possess?	Can the animal be reused? <i>(In all cases the cumulative discomfort may never be more than moderate)</i>
Only a head-post	Yes. The animal can be implanted with a maximum of two implants (e.g. a recording chamber and a set of electrode arrays) in addition to the head-post as part of this protocol.
Head-post, plus one recording chamber or one set of electrode arrays.	Yes. If the implant is still functional, and the research question can be answered using this implant, it is not necessary to perform further surgeries. Depending on the research question one further implant can be implanted.
Head-post, plus two implants (e.g. one set of electrode arrays and one recording chamber).	Yes. No further implants are allowed.
Non-fMRI compatible head-post or implants.	The animal cannot be reused for Animal procedures of type 3.4.4.1. The animal may be reused for Animal procedures of type 3.4.4.2.

There is overlap between the animal studies described in this project and those in two ongoing DEC-approved protocols, before the revised national law came into effect. In the first protocol, entitled "Dual-task interference in the primate visual system", we are investigating the effect of dual-task paradigms on attentional selection. The experiments are ongoing, one animal has been implanted with electrode-arrays and we have already obtained preliminary results showing that attentional resources are shared between the different tasks, an exciting result which gives new insights in the location of the 'bottle-neck' of dual-task performance in which attention must be engaged serially on different tasks. A second monkey has been trained to perform the dual-task and will be implanted with arrays shortly. In the second protocol, entitled "The cortical and subcortical mechanisms for perceptual grouping", we are investigating the attentional networks involved in carrying out the curve-tracing task using combined fMRI and electrophysiological experiments. The experiments are ongoing and we have preliminary fMRI data from one monkey and a second monkey has been implanted with an fMRI compatible head-post.

Additionally, we have two animals who have already received recording array implants and who have been trained to perform attentional tasks as part of other DEC protocols. These two animals would be highly suitable to perform the experiments aimed at addressing sub-aim #3 as the implants are still functional so no further surgeries would be required and the animals are already performing very comparable tasks. These animals will be brought under this license.

After a license for this project has been obtained, all proposed experiments will formally be executed under this new license and we will write new study protocols to replace the current DEC protocols. The six monkeys which are currently assigned to the DEC protocols described above will be included in the number of animals requested for this project. Hence, we will transfer six animals from the ongoing DEC protocols to this license. This means that from the total maximum of 11 animals, 5 would be newly acquired animals.

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	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.4.1	Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This appendix describes neuroimaging and electrophysiological procedures that, together, are aimed at mapping brain areas involved in deploying and shifting attention as well as examining the effects of attention on activity in early visual areas.

Our approach entails the following steps: 1) using neuroimaging to reveal which brain areas are involved in performing an attentionally demanding task, and 2) recording and influencing neural activity from these identified areas to study the underlying neural mechanisms.

The primary outcome parameters are:

i) The behaviour of the animal. The animal will be trained to perform complex attentionally-demanding cognitive tasks such as mentally tracing a complex contour. We also investigate how behaviour depends on alterations of neuronal activity. Will increases/decreases in neuronal activity facilitate or inhibit the attention shifts, just as is observed in some brain disorders?

ii) Neuroimaging data. BOLD or contrast-enhanced CBV data measured with fMRI indicates which brain regions are involved in a particular task. Projecting these functional activity patterns onto structural information obtained with different scan-sequences in the same animal paints a detailed picture of this task-related neural substrate. Moreover, in stimulation experiments, the same functional data will indicate which parts of the brain are influenced by electrical stimulation.

iii) Neural activity recorded from the regions identified in the fMRI data. We will examine the link between neural activity recorded from areas revealed by the fMRI results and the cognitive tasks

performed by the monkey.

The flow of animals through this procedure is as follows:

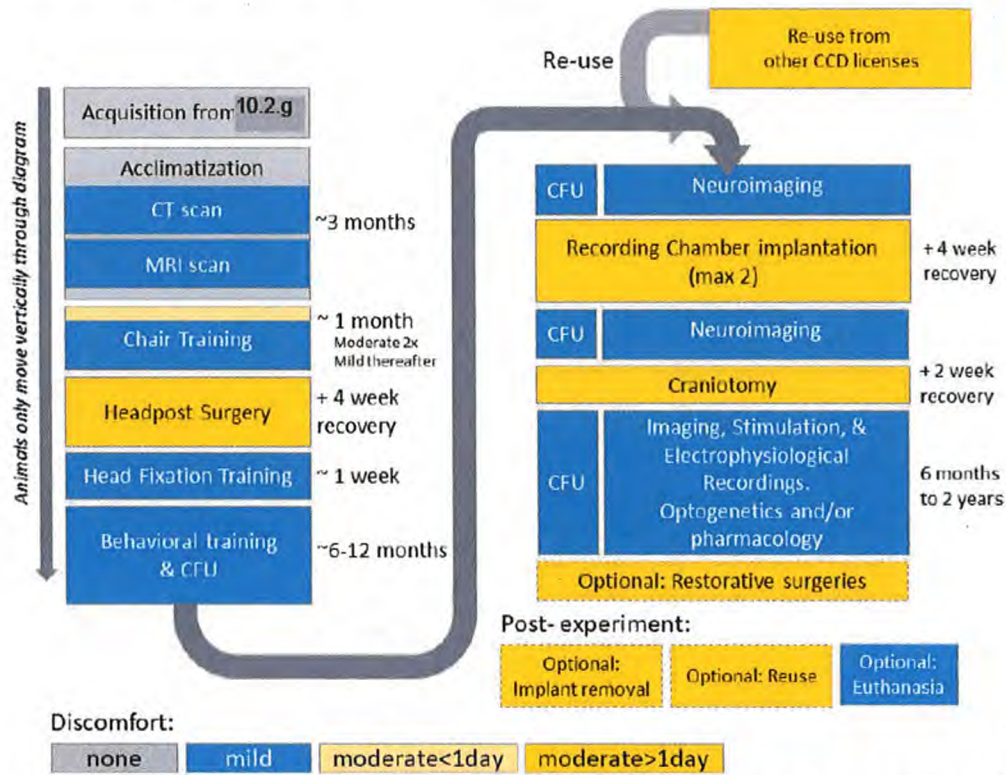


Figure 1 – A flow diagram outlining the steps of procedure 3.4.4.1. The order of the CT and MRI scan may be reversed. CFU refers to periods in which the fluid uptake of the animal is controlled. The procedures to the left are standard procedures that all monkeys in our facility undergo. The procedures 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

situation. Once trained on all these aspects of an imaging experiment, the animals will perform their tasks inside the MRI scanner, while we record global brain activity. In additional sessions under anesthesia, we will acquire fine-grained structural imaging data required for the interpretation of the functional data.

Once the neuroimaging experiments have been set up and initial fMRI data is available, we implant a recording/stimulation chamber that will allow us to target multiple specific brain regions with electrodes for stimulation, neurophysiological recording, pharmacology and optogenetics. The choice of these regions will depend on the results of the fMRI experiments, as well as practical considerations such as which brain areas can be reached from the recording/stimulation chamber(s). The animal will then perform cognitive tasks while we record neural activity and electrically/optogenetically/pharmacologically influence the activity in relevant brain regions. Outside the scanner, this will allow us to investigate if and how stimulation affects behavioural performance. Repeating this approach inside the scanner will furthermore reveal the brain-wide activity patterns associated with these effects. Recording neural activity allows investigation of the activity patterns associated with the cognitive tasks in the same structure, but with more detail, and will complement the fMRI recordings. Electrical/optogenetic/pharmacological experiments allow us to study the causal influence of the neurons on attentional control. This addresses the question whether these neurons are indeed an integral part of the circuit that controls attention.

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

An overview of the procedures and the associated discomfort is presented in the flow chart

Acquisition and housing

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

Acclimatization

Discomfort: Mild or none

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

CT scanning

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia), once per animal (unless complications require re-assessment)

A CT scan may be obtained to allow 3D models of the monkey's skull to be constructed. These are used to custom design surgical implants which perfectly fit the skull of the animal. The monkey is anesthetized in its home cage, and then transferred to the CT scanner. The scanning procedure lasts less than 5

minutes. The monkey is then returned to his home-cage, and he is allowed to recover from 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

the end of the training period the animal is expected to be able to fixate in a 1° diameter window for at least 400 ms and perform delayed saccade-tasks. A saccade is a very rapid eye-movement that monkeys and humans make approximately 3 times per second to direct the eyes to objects of interest. In a delayed-saccade task the animal must wait for a 'go' cue (e.g. the fixation dot changes colour) before making his eye movement. Most animals are also trained to make hand-movements in response to particular visual stimuli during the training period. The duration of this training period varies from 1 to 6 months depending on the aptitude of the monkey. In our experience, all monkeys are able to learn these tasks within 6 months.

Controlled fluid uptake

Discomfort: Mild

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

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

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

We take a number of measures to prevent dehydration:

- The monkeys always receive a minimum of 100ml of fluid each day. If this amount is not reached during the training session, it is supplemented.

- Averaged over a three-day period, the animals must receive a minimum of 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.

Structural neuroimaging under anaesthesia

Discomfort: Mild (recovering from brief anaesthesia), ~4-5 times per animal.

The mapping of functional imaging onto specific brain structures requires much more detailed structural brain information than can be obtained in the brief initial structural scan routinely performed with new animals and mentioned in the above. To obtain such information we need to employ slower scanning sequences, for which motion artefacts are a primary concern. To this end, the monkey is anesthetized in its home cage and then transferred to the MRI facility. The anatomical scan lasts approximately an hour, after which the monkey is returned to his home-cage, and recovers. We expect to need approximately 4 or 5 of these imaging sessions per animal, the results of which can be averaged to reconstruct high-resolution 3D representation of an animal's individual neuroanatomy. Since anaesthesia is only used here to avoid motion, we will use a relatively low dose to minimize the discomfort associated with recovery.

Surgery: Recording chamber implantation / artificial dura (AD)

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

A surgical procedure is carried out under general anaesthesia to implant up to two recording/stimulation chambers. The choice for one or two stimulation chambers depends on the brain areas we plan to stimulate based on neuroimaging results. If these areas can be reached from a single chamber we will only implant one. If, however, some areas require a significantly different point or angle of entry into the brain it is possible that they cannot be reached from the same chamber. In such cases, we will implant two chambers. If this requirement is known before the first chamber is implanted, both chambers will be implanted in the same procedure. In this initial procedure, the skull is left intact. An incision is made in the scalp and the skin is retracted. A recording chamber is placed in a location that allows access to the brain regions that will be targeted with stimulation. The animal receives appropriate analgesics during and after the procedure.

Surgery: Craniotomy

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

A surgical procedure is carried out under general anaesthesia to perform a craniotomy inside the recording chamber(s), allowing access to the underlying brain structures. The animal receives appropriate analgesics during and after the procedure. In some cases, it may be possible to combine the craniotomy procedure with the recording chamber implantation in a single procedure.

If optogenetic experiments are planned which require light-application over a large spatial scale then we will replace the native dura in the recording chamber with an artificial silicone dura (AD). The AD is transparent, allowing application of light to the surface of the brain and soft enough to allow electrodes and pipettes to be moved easily into the brain. The material properties of silicone are excellent as it forms a seal protecting the underlying brain tissue from infection (Figure 3C) and it naturally reseals after the electrode/pipette is removed.

The recording chamber must be cleaned every 2-3 days to prevent infection (both those with Ads and those without). The procedure takes place while the animal is sitting in the primate chair before or after a recording session. The chamber lid is removed and the interior of the chamber is flushed with anti-bacterial solutions such as chlorhexidine. Finally, the chamber is flushed with saline. The total duration of the cleaning procedure is around 5 minutes and it causes no discomfort.

Awake neuroimaging/electrical stimulation/electrophysiological recording

Discomfort: Mild, 1-5 times a week for BOLD, 3-7 consecutive days for contrast-enhanced CBV (followed by 7 days of no contrast-agent).

The awake neuroimaging/electrical stimulation/electrophysiological recording sessions are similar to the behavioural training sessions, with the exception that the monkey is transported to the imaging facility in a closed off cart (~5 min) and either performs the task inside the real MRI scanner and/or the animal is connected to the stimulation/recording equipment. Both the electrical stimulation and the electrophysiological recordings require electrodes to be slowly lowered across the dura into the brain which may cause a brief moment of mild discomfort. In MRI-scanning sessions the monkeys may experience mild discomfort from the loud scanner noise, even though they have been exposed to it during training and we give them earplugs. In our experience, the animals do not show any signs of distress in response to scanner noise. The duration of each session will be between 1-4 hours. Animals are generally either in a recording session or being trained (on a new task, or to maintain performance on 'known' tasks) 5 days a week.

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

in the vicinity of the recording electrode.

2) Large-scale optogenetics with an artificial dura.

In this approach the native dura is removed and replaced with a transparent silicone dura, known as an artificial dura (see above). The AD allows easy access to the brain for recording electrodes/pipettes and light sources can be placed above the AD to illuminate the underlying neural tissue. This approach can be used to apply light over larger areas.

The choice for a small-scale or large-scale approach depends upon the research question.

In both approaches a viral-vector encoding for the light-sensitive protein is first injected into the target area, this is described below.

Surgery: Injection/infusion of viral vector

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)

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

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

In recording chambers with artificial dura it is possible to visualize the fluorescent marker protein that is linked to the opsin through the transparent dura to check the expression of the opsin. This is achieved by using a portable fluorescence microscope or goggle system. This procedure can be performed while the monkey is in the primate chair and does not cause any discomfort. It takes approximately 4 weeks for expression levels to reach high enough levels that the fluorescent protein is visible. We will therefore only check for fluorescence once the monkey has returned to our facility. It is highly likely that the vector we use will successfully transfect cells and drive expression of the opsin protein as we will use promoter sequences and serotypes that have been successfully used in primates in other labs. If it turns out that the first injection does not produce expression, despite a successful injection, we will change the serotype or promoter sequence in future injections.

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

Removing tissue above the dura

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia), once every 1-3 months after craniotomy

In recording chambers without ADs it is sometimes necessary to remove tissue that has grown over the dura within a recording chamber to improve the ease with which electrodes can be moved into the brain. The monkey is lightly anesthetized and the tissue is removed with a specially designed tool. The amount of tissue damage caused by this procedure is minimal and the monkey recovers within an hour after cessation of the anesthesia. The monkey receives analgesics during the procedure.

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

are however typically performed across neurons, a level of detail that is far beyond the resolution of fMRI. In human fMRI studies, a typical project will comprise >10 participants that are each scanned only once or twice. In monkey fMRI, ethical considerations and training investments typically dictate that an experiment is performed in 2-5 animals, each of which is scanned multiple times to obtain reliable results over sessions.

We estimate that to obtain reliable results we will need data from at least three animals, due to the expected variability in cognitive behaviour and imaging results. We thus initially apply for a minimum of three animals. However, because the real variability in results across animals in these experiments is not yet known, this project may require additional measurements in an extra animal. In addition, 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 a behavioural task). In such cases, we will also apply for an additional animal. Applications for an extra animal beyond the initial three will be submitted to the IvD of the institute for permission.

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 the 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 perform covert attentional tasks. The experiments are invasive as they require the implantation of a head-post and further surgical implantations to allow stimulation electrodes to enter the brain. These experiments can therefore not be performed in humans. Macaque monkeys show very similar performance to humans on visual attention tasks and there is a large amount of literature on attentional processing in this species. We already have a broad outline of the anatomy of the attentional control system in macaques meaning we will be able to relate our results to previous findings making interpretation of the results much more powerful. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.

Sex used:

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

Animal number:

Given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. However, we estimate that to obtain reliable results we will need data from at least three animals due to the expected variability in behaviour, anatomy and imaging results. While neurophysiological studies with non-human primates commonly comprise only two animals, data in these experiments is usually obtained from a large number of individual neurons or recording electrodes (for

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, Kuśmierek 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

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. 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.

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, 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.

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 such. 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. In this period, additional analgesics and antibiotics are given to minimize discomfort and the risk for infections.

We constantly monitor the welfare of trained animals, assessing their appearance and behaviour every weekday, with checks by the animal caretakers during the weekend. 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 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.

2. Wounds as a result of fighting with other animals: the social housing structure in the animals' home-cage environment is carefully determined (together with experts in macaque behaviour) and closely monitored. However, fights do sometimes occur between animals to assert dominance, either between cage-mates or between animals in neighbouring cages. These fights usually don't cause any, or only minor superficial, damage, but sometimes it may be necessary to clean a wound and stitch it up. We do believe, however, that the benefit of social housing outweighs the discomfort associated with such occasional fights.

3. The occurrence of weight loss due to the controlled fluid uptake and the measures that we take to prevent dehydration have been described above.

4. 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%).

5. Loosening of an implant.

6. Brain swelling during operations.

7. 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.

8. 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). Interfaces between biological tissue and implants are cleaned regularly to and recording chambers cleaned every few days to minimize the risk for infection.

2. The social housing structure in the animals' home-cage environment is carefully determined (together with experts in macaque behaviour) and closely monitored. Cage-mates are matched based on age (difference), physical appearance and character to avoid ambiguous dominance structures as much as possible. Social structure, however, is a dynamic feature and changes in dominance do occur over time, for instance with aging. When problems start to arise we re-assess the situation and if necessary change the social housing structure.

3. The measures to prevent dehydration due to controlled fluid uptake have been described above.

4. 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.

5. Over the years we have made several refinements to our cranial implants and we continuously review and refine the design of our implants. In the unlikely event that a head post or recording chamber 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.

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

Controlled fluid uptake

Discomfort: Mild

Behavioural training on complex tasks

Discomfort: Mild

Structural neuroimaging under anaesthesia

Discomfort: Mild (recovering from brief anaesthesia)

Surgery: Recording chamber implantation / artificial dura (AD)

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

Cleaning recording chamber

Discomfort: none

Surgery: Craniotomy

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

Microstimulation

Discomfort: Mild

Pharmacological interventions

Discomfort: Mild

Optogenetics

Discomfort: Mild

Surgery: Injection/infusion of viral vector

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)

Awake neuroimaging/electrical stimulation/electrophysiological recording

Discomfort: Mild

At this point the animals are cooperative and experience no discomfort from performing the tasks. They may experience brief mild discomfort from entering electrodes through the dura in electrophysiological recording sessions, and/or the injection of contrast-agent and iron-chelating substances in CBV-imaging sessions. Scanner noise could potentially cause mild discomfort as well, but in our experience the monkeys are not bothered by it much. Being head-fixed for several hours might also cause mild discomfort, but the animals are gradually accustomed to this experience and generally remain either cooperative (performing their task) or fall asleep.

Removing tissue above the dura

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)

Artificial Dura 'refresh' operation

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). There is a maximum of two restorative surgeries per implant.

Surgery: Implant removal

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

Perfusion

Discomfort: Mild or none

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 (rehomed 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



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

10.2.g

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
3.4.4.2	Measurements of neural activity in cognitive tasks.

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The procedures described in this appendix concern measurements of neural activity in tasks investigating the deployment of attention in dual-task paradigms and memory paradigms.

Monkeys will be trained to perform complex cognitive tasks in which they must attend visual objects while ignoring others and keeping their eyes fixed on a different location on the screen. They will be trained to make behavioural choices using an eye-movement and/or hand-movement. The animals will receive intracranial implants which will allow us to monitor neural activity in multiple brain areas while the animal performs the task. We will use 2D 'Utah' arrays of micro-electrodes or 3D arrays of laminar electrodes, which allow a large coverage of cortex and simultaneous recordings from hundreds of neurons. We will use microstimulation, optogenetics and pharmacology to locally alter the neuronal activity. In addition, the animals may receive recording chambers positioned over different visual areas, which will allow us to acutely monitor neural activity in deeper brain structures.

The primary outcome parameters are:

- i) The behaviour of the animal. The animal's accuracy and reaction time on the behavioural tasks will be recorded. We also investigate how behaviour depends on alterations of neuronal activity.
- ii) Neural activity recorded from the electrodes. All electrode types described here can record single- and multi-unit activity and well as the local field potential. We will examine the link between neural activity recorded in different areas of the visual brain and the behaviour of the monkey.

The monkeys will be acquired and acclimatized to the primate facility at 10.2.g. They will undergo structural anatomical scans to guide the design of the surgical implants. The animals will be implanted with a head-post, which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up. The animals will be placed on a controlled fluid regime and trained on basic tasks such as fixating on small regions of a computer screen and making eye-movements to visual targets. After reaching high levels of performance on these basic tasks the animal will then be trained on more complex attention-demanding

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:

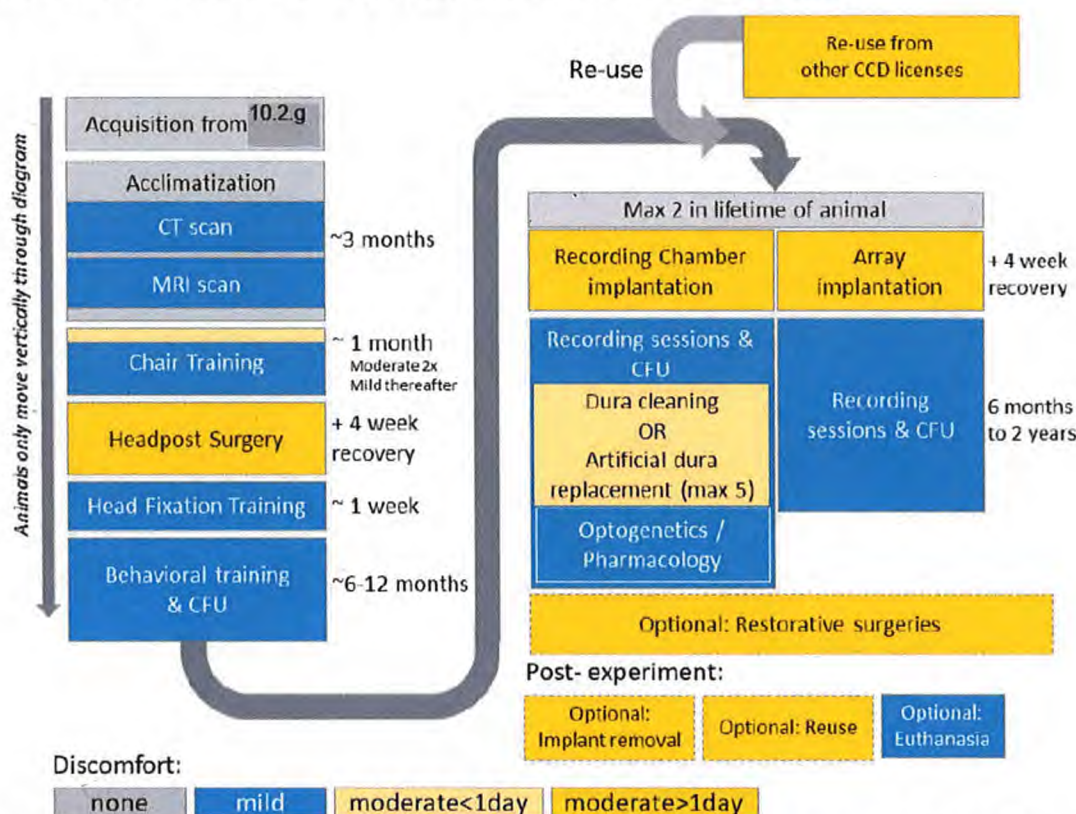


Figure 1 – A flow diagram outlining the steps of procedure 3.4.4.2. The order of the CT and MRI scan may be reversed. CFU refers to periods in which the fluid uptake of the animal is controlled. The procedures to the left are standard procedures that all monkeys in our facility undergo. The procedures 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

animal can receive a maximum of two intracranial implants in the course of their lifetime. This will only be done under the condition that the animal has not experienced serious discomfort and receives, in total, a maximum of two intracranial implants.

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

The following procedures are described fully in Appendix 3.4.4.1

Acquisition and housing
Acclimatization
CT scanning
MRI scanning
Chair training
Surgery: Head-post implantation
Head-fixation training
Behavioural training on basic tasks
Microstimulation
Pharmacological Interventions
Optogenetics
Surgery: Injection/infusion of viral vector
Controlled fluid uptake
Annual health check

The following procedures are specific to this appendix:

Behavioural training on complex tasks

Discomfort: Mild

The goal of the animal experiments described here is to understand how the deployment of attention is controlled by the brain. To this end, we train the monkeys on tasks in which they have to attend to a particular visually presented object or memory and report an aspect of the stimulus. Examples of such tasks include:

Attention tasks: An example is the task in which the monkey mentally traces a curve that is connected to the fixation point while ignoring a distracter curve, and making an eye-movement to a target situated at the end of the curve. This task tests how attention spreads through objects in the visual scene. Other attention shift tasks include a visual search, where the monkey has to find an object with e.g. a specific colour and tasks where some objects attract attention because they stand out from other objects (figure-ground perception).

Dual-task: a variant of the curve-tracing task in which the animal performs a dual-task. The first task is to indicate the location of probe object via a hand-movement, the secondary task is the curve-tracing task which is presented at various delays relative to the first task.

Working memory task: Visual stimuli are presented briefly, and the monkey has to memorize the shape, colour or another feature of one or multiple stimuli. The stimulus disappears and the monkey is cued to report about the visual stimuli by making a hand or eye movement. By presenting cues that point to the more relevant parts of the visual input and at different time-points relative to the main visual display we probe how attention influences the storage of information as neural memory traces and, vice versa, how information in working memory influence the deployment of attention.

The exact tasks will depend on the research question and may evolve on the basis of the results discovered in the early phases of the experiment. In each case the difficulty of the task is slowly increased over days and the presentation of the stimulus is varied along several dimensions (e.g. size and position of the stimulus) to ensure that the monkey can generalise the rule he has learnt.

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.

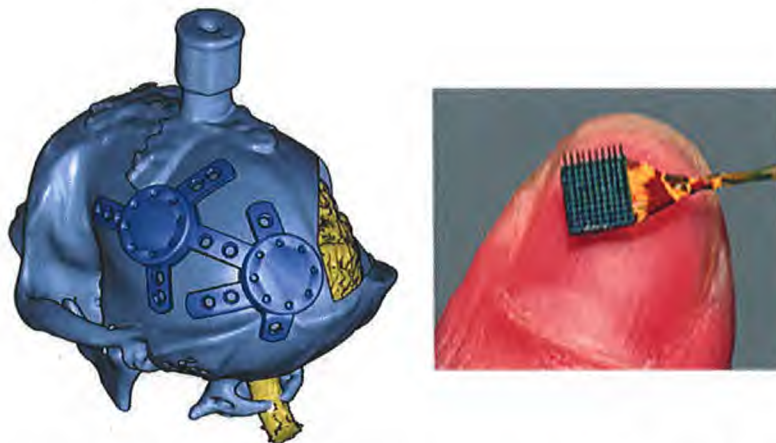


Figure 2. Baseplate and head-post. The image to the left shows a 3D reconstruction of the skull (viewed from the left/rear) from a CT scan of a monkey who had been implanted with a head-post several months prior to the CT. The head-post had become very well integrated into the skull, bone-growth over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

of a 'baseplate' which would be used to attach the electrode-array connectors. The CT scan is used to design and place the baseplate. These 3D models are also used to design recording chambers and to plan the craniotomy for an electrode implantation, for example a proposed skull opening has been shown in this image. The image to the right shows the size of a 2D 'Utah' array (10x10 electrodes).

Surgery: Recording chamber implantation and craniotomy

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

A surgical procedure is carried out under general anaesthesia to perform a craniotomy allowing access to the underlying brain structures. An incision is made in the scalp and the skin is retracted. A small section of skull (~2cm) is removed. A recording chamber is placed around the craniotomy and attached to the skull, with surgical screws and/or dental cement. Whenever possible the recording chamber will be 3D printed to ensure an excellent fit to the skull and will be made of titanium ensuring good bio-compatibility, strength and low weight. The animal receives appropriate analgesics during and after the procedure. The animal also receives drugs which reduce intracranial pressure during the operation (e.g. mannitol, dexamethasone).

As for the array operations, it is also possible to split this operation into two more minor operations. In the first operation a baseplate is implanted which contains a circular ring which will later accept the recording chamber. The skin is resutured above the baseplate and the animal is allowed to recover. This promotes good integration of the baseplate with the skull and reduces the chances of the implant becoming loose. At a later stage, at least 4 weeks after the first operation, a second operation takes place in which the craniotomy is made and the recording chamber is attached to the baseplate.

If optogenetic experiments are planned which require light-application over a large spatial scale then we will replace the native dura in the recording chamber with an artificial silicone dura (AD). The AD is transparent, allowing application of light to the surface of the brain and soft enough to allow electrodes and pipettes to be moved easily into the brain. The material properties of silicone are excellent as it forms a seal protecting the underlying brain tissue from infection (Figure 3C) and it naturally reseals after the electrode/pipette is removed.

The recording chamber must be cleaned every 2-3 days to prevent infection. The procedure takes place while the animal is sitting in the primate chair before or after a recording session. The chamber lid is removed and the interior of the chamber is flushed with anti-bacterial solutions such as chlorhexidine. Finally, the chamber is flushed with saline. The total duration of the cleaning procedure is around 5 minutes and it causes no discomfort.

Recording sessions

Discomfort: Mild

The neural recording sessions follow an identical format to a behavioural training session, with the exception that the monkey is connected to the recording/stimulation equipment. In experiments with recording chambers the electrode will be moved across the dura and into the brain at the start of each recording session, this causes a brief moment of mild discomfort. If pharmacological agents are used these will be applied via a combined recording-electrode/pipette as described in Appendix 3.4.4.1. If optogenetic approaches are used we will use an optrode to apply the light or use a combination of an electrode with an artificial dura and external light sources. The animal's will perform the same tasks as outlined above. The duration of each session will be between 1-5 hours. The total duration of the recording sessions will be between 3 months to 1 year, although the implants remain useable after this time-period.

Removing tissue above the dura

Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)

It is sometimes necessary to remove tissue that has grown over the dura within a recording chamber to improve the ease with which electrodes can be moved into the brain. The monkey is lightly anesthetized and the tissue is removed with a specially designed tool. The amount of tissue damage caused by this procedure is minimal and the monkey recovers within an hour after cessation of the anaesthesia. The monkey receives analgesics during and after the procedure. The frequency of occurrence is approximately once per 3-6 months.

Surgery: Restorative surgeries

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

In rare cases an implant (i.e. head-post, electrode array connector or recording chamber) may become loose. A repair surgery is then performed to prevent failure of the implant. The repair surgery is performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. The nature and duration of the repair surgery depends upon the type of implant and the extent of the problem, 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

perform covert attentional tasks. The experiments are invasive as they require the implantation of a head-post and further surgical implantations to allow stimulation electrodes to enter the brain. These experiments can therefore not be performed in humans. Macaque monkeys show very similar performance to humans on visual attention tasks and there is a large amount of literature on attentional processing in this species. We already have a broad outline of the anatomy of the attentional control system in macaques meaning we will be able to relate our results to previous findings making interpretation of the results much more powerful. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.

Sex used:

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

Animal number:

We expect that at least two animals are necessary in order to obtain reliable results for each experimental question considered. When comparable data is obtained from two individuals it can be assumed that the results are not attributable to individual differences.

The experiments described here will be used to address three sub-aims:

- #2) How does the brain divide resources when performing two tasks simultaneously?
- #3) How is attention directed towards items in memory?
- #4) How do eye-movement control centers direct attention?

We require different animals to address each of these sub-aims. Sub-aim #4 requires recording chambers located over the FEF and superior colliculus whereas the other sub-aims require electrode arrays over visual cortex, these cannot therefore be carried out in the same animal. Sub-aim #2 and #3 both require electrode arrays over visual cortex, but the nature of the tasks is such that separate animals have to be dedicated to these sub-aims. The dual-task of sub-aim #2 is difficult to train and requires that the animal learns both hand and eye movements. The tasks of sub-aim #3 only require eye-movements but the animals must be trained to maintain eye gaze on a location of a computer screen for long periods so that memory can be tested. Given the difficulty of these tasks it is not possible to train the animals to switch between the tasks.

Given that we will use two animals per research question we envisage using 6 animals in the course of this proposal. Note that we have already begun experiments in two monkeys examining how neural activity in visual areas is affected by dual-task performance (#1, as described in the attached document: 'Overview of DEC protocols currently in progress'). These two animals will be brought under this license and will count towards the total number of animals.

Previous studies have obtained reliable results from two animals per question, but given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. It could be possible that data from one animal must eventually be excluded from the analysis, contradictory results arise from the first two monkeys, or ethical considerations require the termination of one animal. Such cases require the acquisition of data from a third animal. The acquisition of a third animal for a particular research question will be performed in consultation with the IvD of the institute. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 projects a third monkey was required (i.e. 22% chance of extra monkey being required per project). Given this value it is likely that we will require one extra animal in addition to the six animals above. We therefore require a potential maximum of 7 newly acquired animals. Note that, due to re-use, the actual number of animals used will be lower than this.

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 electrode arrays/recording chambers implanted in these animals can provide functionally useful signals 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 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

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 such. 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. Behaviour, wound area and appearance will be monitored daily for at least 7 days post-surgery.

After the recovery period, we constantly monitor the welfare of trained animals, assessing their appearance and behaviour every day.

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 understanding the neural mechanisms that underlie the deployment of attention. The applicants are very familiar with the research literature on visual attention 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.

Their fluid uptake will be controlled. The measures we take to reduce adverse effects of restricted fluid uptake have been described in Appendix 3.4.4.1.

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 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

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 their 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 ^{10.2.g} 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 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 (this only occurred once in the past 10 years).

Indicate the likely incidence.

Based on previous experience, 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: 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 anesthesia)

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 anesthesia 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 (rehomed 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.

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 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.

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, or it may be possible for the animals to be transferred to a primate refuge. In these cases, the surgical implants are removed in a further operation.

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



> 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.g20173789
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.g20173789. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

2 november 2017

Aanvraagnummer:

AVC10.2.g 20173789

Datum:
2 november 2017
Aanvraagnummer:
AVC10.2.g 20173789

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10.2.g
Naam instelling of organisatie: [redacted]
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 10.2.e en 10.2.g
Postbus: 10.2.g
Postcode en plaats: [redacted]

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: [redacted]
E-mailadres: [redacted]

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: [redacted]
E-mailadres: [redacted]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

2 november 2017

Aanvraagnummer:

10.2.g 20173789

Over uw project

Geplande startdatum:

15 december 2017

Geplande einddatum:

14 december 2022

Titel project:

Understanding the brain's attentional control systems.

Titel niet-technische samenvatting:

Hersenmechanismen voor de aansturing van aandacht

Naam DEC:

10.2.g

Postadres DEC:

E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

 DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

10.2.e en 10.2.g

Functie:

10.2.e en 10.2.g

Plaats:

10.2.g



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
AVC 10.2.g 20173789
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 AVC 10.2.g 20173789	€ 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.

3789



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

02 NOV. 2017

- 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 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	10.2.g 10.2.e en 10.2.g 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	10.2.g	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.e en 10.2.g 10.2.e en 10.2.g	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres	10.2.e en 10.2.g	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 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?
- Hersenmechanismen 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 10.2.g
- Postadres
- 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 10.2.g

Plaats

Datum 31 - 10 - 2017

Handtekening 10.2.e en 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: AVD10.2.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.

8. Eventueel horen van aanvrager:

- Datum: 19-10-2017
- Plaats: 10.2.9
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5
- Aanwezige (namens) aanvrager: plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- Gestelde vraag / vragen: De mondeling gestelde vragen zijn na afloop van de vergadering ook schriftelijk aan de aanvrager gestuurd. De schriftelijk gestelde vragen (zie onder punt 9; brief 20-10-2017) hebben geresulteerd in aanpassingen van de aanvraag.
- Verstrek(e) antwoord(en): zie punt vraag 9
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag wel; zie onder vraag 9.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum brief van de DEC: 20-10-2017.

Gestelde vragen (samenvatting) 20-10-2017:

Questions/remarks DEC

1. With regard to the motivation for the use of monkeys as experimental animals it might be a good idea to mention similar research to monkeys by other groups to strengthen the argument that for this kind of research other animals (rodents) are unsuitable. Include the fact that only NHP are to maintain their eyes fixed while attention is shifted to another part in the visual field (covert attention) and that rodents will always make an eye movement to the item that has attracted their attention. So attentional control systems are present in rodents but it is not possible to use rodents for studies to discover the underlying mechanisms.
2. Are alternative approaches, not involving the use of NHP, possible to reach the goals or part of the goals?
3. Are other labs in the world working on attentional control but perhaps used different types of tasks?

Reply to related questions 1-3: The goal of the project is to understand visual attention. In humans and other primates, vision is by far the dominant sense and in trying to reach our ultimate goal of understanding human visual attention we need an animal model that also possesses mechanisms that control visual attention and is able to perform visual attention tasks that are comparable to those in humans.

There is currently no evidence that we know of that rodents possess a visuospatial attention system. The rodent retina is uniformly sensitive and there is no physiological need to move the eyes to focus on a particular point in space. Rodents may be able to focus attention on particular somatosensory inputs (i.e. whisker inputs) or to generally focus on one sensory input stream (e.g. audition vs vision), but this is very far removed from the human situation in which attention primarily operates a particular location, object or feature in visual space. This makes rodents unsuited as a model system to study the control of visual attention.

Other animal models, such as the carnivores (e.g. cats, ferrets), do move their eyes in a similar way to humans. However, to measure the effects of attention on neural activity it is critical that the eye movements of the animal can be decoupled from the locus of spatial attention. Cats and ferrets cannot be trained to look at one location and attend to another location and it is therefore not clear if cats/ferrets can covertly attend to visual information. Normally, also in primates, the focus of attention and eye-movements are closely coupled, however primates have evolved the ability to covertly attend to particular visual inputs (eye gaze is a very strong social cue for primates and it is therefore important for primates to be able to attend to an individual without giving the social cue that they are attending to them).

There are also a large number of labs worldwide which work on the primate model of visual attention and a long history of literature which helps to interpret the data. These labs include the Desimone, Fries, Thiele, Moore, Gottlieb, Leopold, Krauzlis, Reynolds, Nieder, Arnsten, Dragoi, Pasupathy, Maunsell, Kohn, Martinez-Trujillo, and Shadlen labs, to name a few. These labs use similar techniques and tasks to our own lab, but the researchers are specialized in different aspects of vis-

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-

visage that these experiments will inform each other and may identify a co-activated brain network 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 would be suitable candidates for re-use in this project and vice versa (depending on the exact locations of the recording chambers) and may reduce the total number of animals required.

(b) The CCD license: "Understanding the neural mechanisms of perception: restoring sight in the blind". In that project, we investigate how micro-stimulation of eye-movement control centers may help to organize the artificial percepts induced using the prosthesis. Here we will gather information on the interactions between eye-movement control centers during attentional tasks, which may help inform the micro-stimulation experiments. An important question is whether users of a visual prosthesis will be able to direct their attention to parts of an artificially imposed percept and to ignore other parts, just as normally sighted people can direct their attention to some visual objects and ignore others. This information has been added to section 3.4.3.

9. The DEC thinks it would be a good idea to add, as before, a list of old DEC-protocol titles to the proposal to indicate that this is ongoing research that will be added to the project.

Reply: We have added the titles of the two DEC protocols to section 3.4.3.

10. Indicate with a table in which way the 3 x 2 monkeys for subgoal 2 differ. This should make clear why the subgoal cannot be reached by using 1 x 2 animals > position of the implants – position of recording chambers – difficulty of learning the tasks.

Reply: We have included a section in the description of the animal numbers for animal procedures 3.4.4.2 which elaborates why different animals are required for each sub-aim.

11. Is there a go/nogo after the AP1 experiments?

Reply: No. The experiments of AP1 are designed to identify brain areas involved in attentional control tasks, such as the curve-tracing task, with a focus on identifying novel areas beyond the visual cortex and FEF/SC. The experiments of AP2 are not dependent on the results of AP1 as they target brain areas which are already known to be involved in attentional control (e.g. visual cortex, FEF/SC).

- Datum antwoord: 26-10-2017

- Verstrek(e) antwoord(en): De aanvrager heeft in de herziene versie de aanvraag gecomplementeerd op bovenstaande punten en de gevraagde aanpassingen doorgevoerd.

Via een schriftelijke ronde van de herziene aanvraag heeft de DEC geconcludeerd dat alle vragen en opmerkingen naar tevredenheid zijn beantwoord. De gevraagde aanvullende informatie is verwerkt in de finale versie van de aanvraag. Het DEC-advies is gebaseerd op de herziene versie.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): niet van toepassing

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest

is.

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.
Nieuwe aanvraag – Zie A4
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
Ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies.
Alle DEC-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.

In antwoord op door de DEC gestelde aanvullende vragen is duidelijk geworden dat het bereiken van subdoel 1 geen voorwaarde is voor het starten van de experimenten voor de andere subdoelen omdat daar hersengebieden zijn gekozen waarvan al bekend is dat ze een rol spelen in aandachtcontrole. Het gebruik van optogenetische technieken is afhankelijk van de uitkomsten in een parallel project maar dit is niet essentieel voor het welslagen van de experimenten.

Het behalen van de subdoelen leidt uiteindelijk tot het bereiken van het hoofddoel. De aanvraag is naar de mening van de DEC te typeren als een project.

Uit de projectbeschrijving en bijlage is duidelijk welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welke procedures en welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.

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

Belangen en waarden

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

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-

den welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn:

> De maximaal 11 resusapen. De integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door de gevangenschap zullen de dieren geen natuurlijk (groeps)gedrag kunnen ontplooiën zoals onder meer natuurlijke omstandigheden. De dieren zullen verschillende periodes van tijdelijk matig ongerief ondervinden ten gevolge van meerdere chirurgische ingrepen die ze in de loop van de proef zullen ondergaan. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet, in een fMRI scanner moeten zitten (AP 3.4.4.1), en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. De dieren worden een aantal keren getransporteerd naar een andere huisvesting om de injectie met virale vectoren mogelijk te maken (AP3.4.4.2) en om te voldoen aan de huidige eisen in het kader van de wet op het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen (GGO). Na afloop van de proef zullen de dieren in de meeste gevallen worden gedood.

> De bij de uitvoering van het project betrokken onderzoekers. Zij zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrièremogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht in de ethische afweging.

> Onderzoekers in het veld van de neurobiologie. Dit onderzoek kent een grote fundamenteel-wetenschappelijke component en de te verwachte toename van de kennis over de hersenmechanismen waarmee aandacht wordt aangestuurd zal met peers en het publiek worden gedeeld via publicaties. De wetenschappelijke resultaten zijn van algemeen belang om de werking van het brein beter te begrijpen en zullen bijdragen aan een beter begrip van aandachtsstoornissen.

> De doelgroepen in de maatschappij. Aandacht is een fundamenteel biologisch proces en speelt een cruciale rol in vrijwel al onze gedragingen. Het is moeilijk aan te geven wat de reikwijdte van de verkregen kennis is. Wel zijn er specifieke en grote patiëntenpopulaties aan te geven (ADHD, autisme, schizofrenie en de ziekte van alzheimer) waar problemen met aandacht een rol spelen. Dit is op zich een groot belang maar het project zal pas op lange termijn concrete resultaten opleveren die in deze context van waarde zijn.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Nee. Zoals gesteld onder C2 heeft de biologischeveiligheidsfunctionaris (BVF) van het betrokken instituut de IvD en DEC op eigen initiatief geïnformeerd dat de juiste GGO vergunningen met betrekking tot de veiligheid van medewerkers en het milieu zijn verkregen. Het instituut werkt al geruime tijd met resusapen en wordt regelmatig door de NVWA geïnspecteerd.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Gezien de trackrecord en het al verrichte vooronderzoek van de groep is de DEC ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte infrastructuur 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 en het instituut door het gebruik van optogenetica

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 gezien 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

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 oogbeweging naar het object van aandacht. Andere diersoorten (honden, katten, varkens, muizen, ratten) die mogelijke 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 primaten 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 de inzet van resusapen (*Macaca mulatta*) noodzakelijk is.

- 10.** Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De onderzoeksgroep doet veel moeite om de dieren sociaal te huisvesten en een verrijkte omgeving te bieden. Er is contact met een etholoog die adviezen geeft om een optimale selectie te maken voor de gepaarde huisvesting van de dieren en om binnen de mogelijkheden die er zijn de huisvestingcondities verder te verbeteren.

De wettelijke voorwaarden met betrekking tot het gebruik van GGO's in grote proefdieren vereisen dat de injecties met de virale vectoren worden uitgevoerd in een DM-III faciliteit. Het aanvragende instituut beschikt niet over een dergelijke faciliteit en daarom is een tijdelijke huisvesting elders noodzakelijk. De dieren blijven sociaal gehuisvest en worden gewend aan het verblijf in een transportkooi. De tijdelijke huisvesting op DM-III voldoet, volgens informatie van de IvD, aan de gestelde eisen. Ook voor de fMRI studies is een korte periode van transport noodzakelijk.
- 11.** Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk

te voorkomen. De onderzoekers hebben veel ervaring met dit onderzoek en zijn 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 (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 vervolgentexperimenten 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.

- 12.** Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).
De integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door het leven in gevangenschap zullen de dieren zich niet kunnen ontplooiën zoals in een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. De dieren worden weliswaar paarsgewijs gehuisvest, dit is een belangrijke verbetering t.o.v. solitaire huisvesting, maar het stelt de resusapen niet in staat om een normale sociale groepsstructuur te vormen. Ook met de talrijke "verrijkingen" die de dieren worden verstrekt, kan niet volledig worden voldaan aan hun sociale en psychische behoeften. Prikkel en omstandigheden waaraan de dieren in natuurlijke omstandigheden voldoening of welzijn zouden ontleen worden zoveel mogelijk nagebootst of vervangen door andere prikkels en omstandigheden waarvan men aanneemt dat die een vergelijkbaar effect zullen hebben. Feit blijft echter dat het om een kunstmatige omgeving gaat waarin men onvermijdelijk op beperkingen stuit. Er worden de dieren ervaringen die hen voldoening en plezier geven onthouden (zie ook C11). Ten behoeve van de experimenten worden diverse implantaten in en op het hoofd aangebracht. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. Na afloop van de proef, of na hergebruik, zullen de dieren merendeels worden gedood.
- 13.** Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
De humane eindpunten zijn voor elk van de bijlagen dierproeven duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken; dit op basis van ervaring. De aanvrager zal gedurende de gehele uitvoering van de proef het welzijn nauwgezet monitoren. De DEC is daarom van mening dat de aanvrager, indien de dieren toch een humaan eindpunt bereiken, tijdig in kan grijpen om onnodig lijden te voorkomen.

3V's

- 14.** Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
De DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. Het onderzoek heeft als doelstelling het begrijpen van de hersenmechanismen waarmee aandachtsverschuivingen wordt aangestuurd en hiervoor zijn complexe gedragstaken noodzakelijk. De voorgestelde proeven zijn niet mogelijk in de mens gezien de risico's van intracraniale injecties, het herhaald inbrengen van elektrodes en de kans op levensbedreigende infecties rondom het implantaat. Het

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-

dronken water vindt plaats om zo uitdroging en schade op de langere termijn te voorkomen. De virale vectoren zijn vooraf getest op functionaliteit en veiligheid. De chirurgische ingrepen worden door ervaren personeel uitgevoerd. De implantaten worden aangepast aan de individuele dieren zodat het de kans op complicaties wordt verminderd. De dieren worden sociaal gehuisvest in tweetallen in een verrijkte omgeving. Zij blijven sociaal gehuisvest tijdens het verblijf buiten het Instituut i.v.m. de injecties met virale vectoren. De verwachting is dat humane eindpunten, om redenen van lijden van het dier, zelden zullen worden bereikt.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

Naar verwachting zullen de meeste dieren in proef na afloop worden gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt; voornamelijk ten behoeven van histologische doeleinden (lokalisatie van de geïmplanteerde elektrodes en expressie van de eiwitten die door virale vectoren tot expressie zijn gebracht). Zie voor details onder C11 en C19.

- 18.** Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*; zie *bijlage I voor voorbeeld*).

De aanvrager gebruikt uitsluitend mannelijke dieren omdat mannelijke dieren zich makkelijker aanpassen aan de gepaarde huisvesting dan vrouwelijke dieren. 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.

- 19.** Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

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

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

Wanneer er geen noodzaak is tot doden kan het dier ook gaan deelnemen aan experimenten onder andere CCD vergunningen ("re-use"; zie C11). 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, 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 herenmechanismen 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

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. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC is van mening dat de benoemde belangen van de wetenschap en samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. De volgende overwegingen hebben bijgedragen tot deze conclusie:

- Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename 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.
- 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.

** 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 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 vervolggelaximenten 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

een dier voor vervolggexperimenten 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 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.



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

effects of restricted fluid uptake have been described above (in de bijlage dierproeven onder A).

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

- 3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks. / 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 unlikely that there are differences between the sexes in basic cognitive behaviour. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.
- 3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks / Rhesusapen (Macaca mulatta): Zie 3.4.4.1.

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

2 DEC advies

DEC-advies	CITAAT. -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.

-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 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 primaten 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

de inzet van resusapen (*Macaca mulatta*) noodzakelijk is.

-De wettelijke voorwaarden met betrekking tot het gebruik van GGO's in grote proefdiereenheden 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. Ook voor de fMRI studies is een korte periode van transport noodzakelijk.

-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 (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 één 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 dieren worden geleidelijk blootgesteld aan nieuwe aspecten van de uitvoering van de gedragstaken. Een nauwgezette registratie van de hoeveelheid gedronken water vindt plaats om zo uitdroging en schade op de langere termijn te voorkomen.

-De aanvrager gebruikt uitsluitend mannelijke dieren omdat mannelijke dieren zich makkelijker aanpassen aan de gepaarde huisvesting dan vrouwelijke dieren. 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.

Ethische afweging van de DEC:

CITAAT.

1. 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. 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 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.

* 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.

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

Het DEC advies is Verlenen onder voorwaarden
CITAAT. 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 11 dieren te gebruiken is een wijziging noodzakelijk.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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 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 vervolggexperimenten 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 een dier

voor vervollexperimenten 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.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. De DEC maakt geen gebruik van standaardzinnen en onderbouwt haar antwoorden op een specifieke en heldere wijze. De DEC benoemt ook een aantal discussiepunten in haar advies. De benoemde dilemma's en voorgestelde voorwaarde volgen op logische wijze uit de rest van het advies. De DEC beoordeelt niet of de individuele huisvesting en toepassing van waterdeprivatie voldoende is onderbouwd. Het Secretariaat heeft de DEC daar voor de volledigheid nog een vraag over gesteld.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Doelstelling Doelstelling	<p>CITAAT.</p> <p>The main aim of this study is to investigate the neural mechanisms by which the brain controls attention shifts.</p> <p>During this project we will focus on four sub-aims:</p> <ol style="list-style-type: none">1) The brain areas which control attention2) How does the brain divide resources when performing two tasks simultaneously?3) How is attention directed towards items in memory?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?
Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>CITAAT.</p> <p>Scientific relevance</p> <p>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</p>

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

Wetenschappelijke kwaliteit

Kwaliteit aanvrager/
onderzoeksgroep en
onderzoek

De DEC zegt hierover het volgende: Gezien de trackrecord en het al verrichte vooronderzoek van de groep is de DEC ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte infrastructuur 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 resus-aperen binnen de groep. De benodigde kennis en ervaring m.b.t. het gebruik van virale vectoren is aanwezig binnen de groep en het instituut door het gebruik van optogenetica op muizen en ratten en deze techniek wordt binnen een ander CCD project geoptimaliseerd in resusaperen. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.

11.1

3V's

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>

Verminderen	
	<p>3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.: CITAAT.</p> <p>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.</p>
	<p>3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks: 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. 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.</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.

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

3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks: CITAAT. Where possible. The electrode arrays/recording chambers implanted in these animals can provide functionally useful signals 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 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.

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.	Ja	volgens de richtlijn.
3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks	Ja	volgens de richtlijn.

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

11.1

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

Dieren worden na de operatie(s) enkele dagen individueel gehuisvest om de dieren te laten herstellen. ^{11.1}

Voor een deel van de proeven wordt waterdeprivatie toegepast. Het Secretariaat is van mening dat ^{11.1}

Er is sprake van hergebruik. De aanvrager voldoet hier aan de vereisten in de wet.

De aanvrager gebruikt alleen mannelijke dieren. ^{11.1}

De DEC benoemt een drietal dilemma's: 1) het al dan niet toepassen van hergebruik, 2) de problematische inschatting van het niveau van cumulatief ongerief en 3) de opvang na afloop van de proef versus doden van de dieren. Deze dilemma's zijn eerder door deze DEC benoemt. De CCD heeft in de bespreking van de desbetreffende aanvraag uitgebreid bij deze dilemma's stilgestaan. Naar aanleiding daarvan is besloten het NCad advies te vragen over het inschatten van het cumulatief ongerief. Bij een recente aanvraag van deze aanvrager is echter besloten om vooralsnog mee te gaan met de maximale ongeriefclassificatie van Matig.

De DEC stelt een voorwaarde voor: dat vanwege mogelijke uitval de vergunning zou moeten worden afgegeven voor maximaal 11 dieren. Aangezien er ook maximaal 11 dieren worden aangevraagd, hoeft geen aanvullende voorwaarde aan de vergunning te worden toegevoegd.

De NTS is langer dan 500 woorden. Het Secretariaat heeft de aanvrager daarom gevraagd de NTS in te korten.

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

5.2 lid 1

Hierbij stelt het Secretariaat voor de volgende voorwaarden te stellen:

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 december 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 formeel onder deze vergunning gaan vallen. 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.

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

8 Concept beschikking voor akkoord CCD

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"
 Onderwerp: RE: 10.2.g 20173789: vragen DEC
 Datum: maandag 11 december 2017 18:27:09

Geachte CCD, beste 10.2.e

In antwoord op uw vraag. De waterregulering zoals beschreven in deze studie is in alle reeds vergunde projecten 'apenprotocollen' van dezelfde onderzoeksgroep op telkens identieke wijze beschreven. In het huidige advies noemt de DEC: " ... verschillende langere periodes waarin de aap gedragstaken moet uitvoeren onder milde druk van waterrestrictie (mild ongerief). De DEC is het eens met deze kwalificatie van het ongerief." Een oordeel van de DEC over de motivatie van de waterdeprivatie wordt inderdaad niet expliciet gegeven.

Als aanvulling op het uitgebrachte DEC advies: ' Alle procedures rondom de waterregulering zijn gedetailleerd en afdoende beschreven in de bijlagen. In de optiek van de DEC is ook de noodzaak tot een motiveringsmaatregel afdoende onderbouwd in bijlage 1 op pagina 5. Het gaat bij dit type proeven om concentratie-vergende taken en het dier moet per meetsessie vele trials uitvoeren voor een valide statistiek. Het is bekend dat dit niet lukt zonder een lichte vorm van motivatie. De keuze voor waterregulering is goed gemotiveerd, mogelijke alternatieven zijn beschreven en de uiteindelijke keuze voor waterregulering is afdoende gemotiveerd. De maatregelen om uitdroging te voorkomen zijn uitgebreid beschreven en zijn afdoende.

De DEC is tot de conclusie gekomen dat, in het kader van de proeven, waterregulering noodzakelijk is en de beste keuze om de dieren te motiveren.'

Met vriendelijke groeten,

Namens de 10.2.g 10.2.e en 10.2.g

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: maandag 11 december 2017 10:43
To: secretariaat DEC
Subject: AVD 10.2.g 20173789: vragen DEC

11

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag in behandeling waarover u advies heeft uitgebracht. Het betreft aanvraag 10.2.g 20173789.

In de aanvraag wordt waterdeprivatie toegepast. Kunt u aangeven of u van mening bent dat het toepassen van waterdeprivatie voldoende is onderbouwd? Wij ontvangen uw reactie graag uiterlijk 14 december 2017.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [secretariaat DEC](mailto:secretariaat_DEC@zbo-ccd.nl)
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.

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

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

14

13

18 december 2017

Project AVD-10.2.g 20173789

Geachte medewerkers van de CCD,

Hierbij stuur ik u, n.a.v. uw verzoek, een verbeterde versie van de NTS. We hebben de NTS ingekort en vereenvoudigd.

In uw e-mail stelt u dat "gecontroleerde vochtopname" door de CCD wordt opgevat als verhullend taalgebruik en dat de term "deprivatie" beter zou zijn. De term "gecontroleerde vochtopname" is de vertaling van de Engelse term "controlled fluid uptake". Dit is de meest gangbare term voor deze procedure voor het trainen van proefdieren in de internationale literatuur. Deprivatie wordt meestal uitgelegd als de *totale onthouding van vocht of voedsel voor meer dan 24 uur*. Dit is anders dan de procedures die in onze projectaanvraag beschreven staan. Het vervangen van "gecontroleerde vochtopname" door "deprivatie" zou daarom onjuist zijn. Om dit dilemma op te lossen hebben we in de aangepaste NTS gekozen voor de term "restrictie" omdat deze term niets verhult maar ook geen onjuiste interpretatie kan opleveren.

In de NTS kozen we voor de volgende formulering: "De dieren worden getraind met een restrictieregime waarbij zij de benodigde dagelijkse hoeveelheid vocht als beloning krijgen tijdens de training."

Met hartelijke groet,

10.2.e en 10.2.g



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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek
- 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

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

4.1 **Vervanging**

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

Om 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 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 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.

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



17

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

10.2.g

10.2.e en 10.2.g

10.2.g

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
10.2.g 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.

Datum:
19 december 2017
Aanvraagnummer:
10.2.g 20173789

Nadere vragen aanvrager

Op 11 december 2017 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op 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 vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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

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).

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

10.2.g

Adres:

10.2.g

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 december 2017 tot en met 14 december 2022, voor het project "Understanding the brain's attentional control systems." met aanvraagnummer AVD^{10.2.g} 20173789, volgens advies van Dierexperimentencommissie^{10.2.g}

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

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

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 1 november 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 1 november 2017;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks., zoals ontvange op 1 november 2017;
 - 3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks, zoals ontvangen op 1 november 2017;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 18 december 2017;
 - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 1 november 2017
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 december 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1. Neuroimaging (MRI) and Neurophysiological Recordings during Cognitive Tasks.			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	4	100,0% Matig
3.4.4.2. Measurements of neural activity in cognitive tasks			
	Rhesusapen (Macaca mulatta)	7	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 december 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken

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

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 onvereenigbaar 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:

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

Aanvraagnummer:
AVD10.2.g 20173789

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 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



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

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)
- 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

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

4.1 **Vervanging**

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

Om 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 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 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.

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen
