

# Impacto da estimulação vagal na indução e interrupção de fibrilhação auricular no modelo do coração de coelho *in vivo* [27]

MÁRIO OLIVEIRA<sup>1</sup>, M. NOGUEIRA DA SILVA<sup>1</sup>, VERA GERALDES<sup>1</sup>, GABRIELA POSTOLACHE<sup>1</sup>,  
RITA XAVIER<sup>2</sup>, SÉRGIO LARANJO<sup>1</sup>, ISABEL ROCHA<sup>1</sup>, RUI FERREIRA<sup>1</sup>,  
LUÍS SILVA-CARVALHO,

<sup>1</sup> Serviço de Cardiologia do Hospital de Santa Marta, Lisboa, Portugal  
<sup>2</sup> Unidade de Sistema Nervoso Autónomo, Instituto de Medicina Molecular,  
Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, Portugal

**Rev Port Cardiol 2010; 29 (03): 375-389**

## RESUMO

A actividade vagal pode influenciar propriedades electrofisiológicas do tecido auricular que contribuem para a ocorrência de fibrilhação auricular (FA).

*Objectivo:* avaliar os efeitos da estimulação vagal aguda (estim\_vag) na condução e refractariedade das aurículas e veias pulmonares (VP) e a vulnerabilidade para a indução de FA num modelo de coração de coelho com inervação autonómica preservada.

*Métodos:* Coelhos New Zealand de ambos os sexos (n=11, 3.9-5.0 Kg), anestesiados com pentobarbital sódico. Para a abordagem de “toráx-aberto” procedeu-se a entubação e ventilação após bloqueio neuro-muscular. O ECG foi obtido a partir de 3 derivações dos membros. Os electrogramas auriculares foram registados com 4 eléctrodos monopolares colocados na superfície epicárdica distribuídos ao longo das aurículas, com um eléctrodo circular adaptado à porção proximal das VP esquerdas. A estimulação eléctrica do nervo vago cervical direito foi efectuada com eléctrodos bipolares de platina (20Hz). O período refractário efectivo (PRE), a

## ABSTRACT

### Effects of vagal stimulation on induction and termination of atrial fibrillation in an *in vivo* rabbit heart model

*Introduction:* Vagal activity is thought to influence atrial electrophysiological properties and play a role in the initiation and maintenance of atrial fibrillation (AF). In this study, we assessed the effects of acute vagal stimulation (vagus\_stim) on atrial conduction times, atrial and pulmonary vein (PV) refractoriness, and vulnerability to induction of AF in the rabbit heart with intact autonomic innervation.

*Methods:* An open-chest epicardial approach was performed in 11 rabbits (New Zealand; 3.9-5.0 kg), anesthetized and artificially ventilated after neuromuscular blockade. A 3-lead ECG was obtained. Atrial electrograms were recorded along the atria, from right to left (four monopolar electrodes), together with a circular electrode adapted for proximal left PV assessment. Acute vagus nerve stimulation was obtained with bipolar electrodes (20 Hz). Epicardial activation was recorded in

dispersão da refractariedade (Disp\_A) e a condução entre a aurícula direita lateral-alta (AD) e a aurícula esquerda lateral-alta (AE) e entre a AD e as VP foram avaliados em condições basais e durante estim\_vag.

Para indução de FA, procedeu-se a estimulação auricular rápida (50Hz, 10 s, isolada ou com estim\_vag) com eléctrodo bipolar no apêndice auricular direito (AAD), apêndice auricular esquerdo (AAE) e VP.

**Resultados:** Registou-se um atraso significativo na activação da AD para as VP, não influenciado pela estim\_vag. O PRE das VP foi inferior ao da AE e AAE, sem diferença significativa relativamente à AD e AAD. Durante estim\_vag: o intervalo de condução interauricular variou de  $16\pm 8$  ms para  $27\pm 6$  ms ( $p<0.05$ ), o PRE encurtou significativamente na AD, AAE, AE e PV, mas não no AAD e não se obteve diferença significativa na Disp\_A. Induziu-se FA em 45% dos coelhos com 50Hz e em 100% com 50Hz + estim\_vag ( $p<0.05$ ). A duração da FA foi de  $1.0\pm 0.2$  s e  $12.0\pm 4.5$  s, com 50Hz e 50Hz + estim\_vag, respectivamente ( $p<0.01$ ), sendo interrompida imediatamente após suspensão da estim\_vag em 80% dos 5 coelhos com FA  $>10$ s. Em 3 animais, induziu-se taquicardia das VP de modo consistente com *pacings* de alta-frequência durante estim\_vag, activando as aurículas com condução fibrilatória.

**Conclusões:** A estim\_vag diminui o PRE das aurículas e VP e a velocidade de condução interauricular, potenciando a indução e duração de FA no modelo do coração de coelho *in vivo*. Os resultados sugerem que este modelo experimental pode contribuir para o estudo da influência autonómica na fisiopatologia da FA.

**Palavras-chave:**

Fibrilhação auricular; Estimulação vagal; Refractariedade; Velocidade de condução; Modelo animal

sinus rhythm, and the conduction time from right (RA) to left atrium (LA), and from RA to PVs, was measured in basal conditions and during vagus\_stim. The atrial effective refractory period (ERP) and dispersion of refractoriness (Disp\_A) were analyzed.

Vulnerability to AF induction was assessed at the right (RAA) and left (LAA) atrial appendages and the PVs. Atrial stimulation (50 Hz) was performed alone or combined with vagus\_stim. Heart rate and blood pressure were monitored.

**Results:** In basal conditions, there was a significant delay in conduction from RA to PVs, not influenced by vagus\_stim, and the PV ERPs were shorter than those measured in LA and LAA, but without significant differences compared to RA and RAA. During vagus\_stim, conduction times between RA and LA increased from  $16\pm 8$  ms to  $27\pm 6$  ms ( $p<0.05$ ) and ERPs shortened significantly in RA, LAA and LA ( $p<0.05$ ), but not in RAA. There were no significant differences in Disp\_A. AF induction was reproducible in 45% of cases at 50 Hz and in 100% at 50 Hz+vagus\_stim ( $p<0.05$ ). The duration of inducible AF increased from  $1.0\pm 0.2$  s to  $12.0\pm 4.5$  s with 50 Hz+vagus\_stim ( $p<0.01$ ). AF lasted  $>10$  s in 45.4% of rabbits during vagus\_stim, and ceased after vagus\_stim in 4 out of these 5 cases. In 3 animals, PV tachycardia, with fibrillatory conduction, was induced with 50 Hz PV pacing during vagus\_stim.

**Conclusions:** Vagus\_stim reduces interatrial conduction velocity and significantly shortens atrial ERP, contributing to the induction and duration of AF episodes in the *in vivo* rabbit heart. This model may be useful for the assessment of autonomic influence on the pathophysiology of AF.

**Key words**

Atrial fibrillation; Vagal stimulation; Atrial refractoriness; Conduction velocity; Animal experimental model

## INTRODUÇÃO

A fibrilhação auricular (FA) é a arritmia mantida mais frequentemente encontrada na prática clínica<sup>(1-2)</sup>. Apesar dos desenvolvimentos recentes alcançados na abordagem terapêutica desta arritmia não estão completamente esclarecidos os mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos episódios recorrentes e à manutenção da FA. A demonstração de que os períodos refractários e o aumento da sua dispersão espacial proporcionam um substrato para a reentrada de múltiplas ondas de propagação (*wavelets*) tem contribuído para o interesse crescente do estudo destas propriedades eléctricas do tecido auricular e sua importância nos episódios de FA<sup>(3)</sup>. Por outro lado, a FA pode ser desencadeada por factores *trigger*, resultantes de actividade focal rápida, sobretudo das veias pulmonares (VP)<sup>(4)</sup>. Estes aspectos electrofisiológicos são, provavelmente, modulados pela actividade do sistema nervoso autónomo (SNA)<sup>(5)</sup>. De facto, os episódios de FA paroxística são frequentemente precedidos por flutuações do balanço autonómico, que têm sido reconhecidas como desempenhando um papel potencial na fisiopatologia da arritmia<sup>(6,7)</sup>. Desde a descrição de FA “vagal” por Coumel, tem sido aceite que o aumento do tónus vagal pode predispor o aparecimento de FA<sup>(8)</sup>. A estimulação vagal modifica a velocidade de condução e a refractariedade auriculares de modo heterogéneo, facilitando a ocorrência de arritmias de reentrada<sup>(9,10)</sup>. Neste contexto da influência autonómica nas propriedades electrofisiológicas e vulnerabilidade para FA, o papel das variações do tónus vagal tem sido mais valorizado, provavelmente porque os efeitos da actividade simpática têm uma distribuição auricular mais homogénea, contribuindo de forma menos relevante para a génese da FA<sup>(10)</sup>. Sharifov et al, no modelo do cão, demonstraram que a infusão directa de acetilcolina na artéria do nódulo sinusal podia induzir FA em 100% dos casos, enquanto a administração de isoproterenol e adrenalina induziam FA em apenas 21%<sup>(11)</sup>. Estudos em humanos, têm mostrado que a actividade vagal se associa a maior

## INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained arrhythmia in clinical practice<sup>(1,2)</sup>. Despite recent advances in treatment, the pathophysiological mechanisms underlying recurrence and maintenance of AF are not fully understood. Evidence that atrial effective refractory periods (ERPs) and increased spatial dispersion of refractoriness provide an electrophysiological substrate for multiple reentry wavelets has aroused interest in studying these electrical properties and their importance in episodes of AF<sup>(3)</sup>. However, AF can be triggered by rapid focal activity, particularly in the pulmonary veins (PVs)<sup>(4)</sup>. These electrophysiological factors are probably modulated by the autonomic nervous system (ANS)<sup>(5)</sup>. Episodes of paroxysmal AF are frequently preceded by changes in autonomic balance, which are thought to play a role in the pathophysiology of the arrhythmia<sup>(6,7)</sup>. Since Coumel's description of “vagal” AF, it has been accepted that increased vagal tone can predispose to the appearance of AF<sup>(8)</sup>. Vagal stimulation alters atrial conduction velocity and refractoriness in a heterogeneous fashion, thereby promoting reentrant arrhythmias<sup>(9,10)</sup>. Studies on the autonomic influence on electrophysiological properties and vulnerability to AF have focused more on the role of variations in vagal tone, as the effects of sympathetic activity are distributed more homogeneously in the atria and are therefore less important in the genesis of AF<sup>(10)</sup>. In a canine model, Sharifov et al. demonstrated that direct infusion of acetylcholine in the sinus node artery induces AF in 100% of cases, while isoproterenol and adrenaline do so in only 21%<sup>(11)</sup>. Studies in humans have shown that vagal activity is associated with greater propensity for spontaneous AF episodes as well as greater likelihood of inducing AF during electrophysiological study<sup>(6,12,13)</sup>. Rapid focal activity in the PVs can induce AF and has also been reported in patients with persistent AF, which suggests that it may have a role in the initiation and maintenance of AF<sup>(4,14)</sup>. The density of innervation in the PVs

propensão para episódios espontâneos de FA e também a maior facilidade na indução de FA durante o estudo electrofisiológico<sup>(6,12,13)</sup>. A actividade focal rápida nas VP pode induzir FA e tem sido também descrita em doentes com FA persistente, sugerindo um papel potencial no início e manutenção da FA<sup>(4,14)</sup>. Sendo as VP estruturas densamente inervadas, torna-se admissível que o SNA esteja na base da actividade repetitiva local. No entanto, permanece por esclarecer qual o impacto da estimulação vagal aguda na arritmogénese das VP ou a implicação da taquicardia das VP (TVP) mediada pelo vago como mecanismo potencial na FA paroxística. No presente estudo, foi avaliada a influência da estimulação vagal na condução e refractariedade da aurículas e VP, bem como na indução e duração de TVP e FA, numa preparação de coração de coelho com inervação autonómica preservada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação do Modelo Animal

Foram utilizados coelhos New-Zealand brancos, de ambos os sexos (n=11, 3.9-5.0 kg), anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.v.). Foi colocada uma cânula abaixo da laringe, através duma traqueostomia para ventilação intermitente com pressão positiva e mistura de ar com O<sub>2</sub> (modelo 607, Harvard Apparatus, Millis, MA, USA; 60 ciclos/min) após bloqueio neuromuscular (pancurónio 4 mg/kg/h, i.v.). O grau de anestesia foi avaliado com base na monitorização da pressão arterial (PA), frequência cardíaca e actividade respiratória, utilizando-se doses suplementares dos fármacos para manter um efeito estável da anestesia geral. A bexiga foi cateterizada e drenada. A artéria femural foi canalizada para monitorização contínua da PA (transdutor SensoNor 840) e a veia femural usada para administração de fármacos. A temperatura rectal foi mantida a ~37°C com recurso a uma placa de aquecimento colocada debaixo do animal. Procedemos a esternotomia mediana e abertura do pericárdio para exposição do coração e abordagem electrofi-

means that the ANS may well underlie repetitive local activity. However, the effects of acute vagal stimulation on arrhythmogenesis in the PVs, and the role of vagally mediated pulmonary vein tachycardia (PVT) as a possible mechanism in paroxysmal AF, remain to be determined. In the present study, we assessed the influence of vagal stimulation on atrial conduction times, atrial and PVs refractoriness, and induction of PVT and AF, in a preparation of rabbit heart with intact autonomic innervation.

## METHODS

### Preparation of the animal model

White New Zealand rabbits of both sexes (n=11, 3.9-5.0 kg) were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, iv). A cannula was inserted below the larynx by tracheostomy for intermittent ventilation with positive pressure and an air/O<sub>2</sub> mixture (model 607 respiration pump, Harvard Apparatus, Millis, MA, USA; 60 cycles/min) after neuromuscular blockade (pancuronium 4 mg/kg/h, iv). The level of anesthesia was assessed by monitoring blood pressure (BP), heart rate and respiratory activity and stable general anesthesia was ensured by the use of supplementary drug doses. The bladder was catheterized and drained. The femoral artery was cannulated for continuous BP monitoring using a SensoNor 840 transducer and the femoral vein was used for administration of the drugs. Rectal temperature was maintained at ~37 °C by means of a heating pad placed under the animal. A median sternotomy was performed and the pericardium opened to expose the heart and for epicardial electrophysiological study. Following thoracotomy, an end-expiratory pressure of 1-2 cmH<sub>2</sub>O was maintained. The ECG trace was obtained with bipolar cutaneous electrodes placed on all four limbs and the signal was amplified and filtered. The ECG, BP and electrograms were continuously monitored on a polygraph (Lectromed, Hertfordshire, UK) and analyzed by software (PowerLab, ADInstruments).

siológica epicárdica. Depois da toracotomia, manteve-se uma pressão final expiratória de 1-2 cmH<sub>2</sub>O. O registo de ECG obteve-se com eléctrodos bipolares cutâneos colocados nos quatro membros, com amplificação e filtragem do sinal. O ECG, a PA e os electrogramas foram continuamente monitorizados num polígrafo (Lectromed, Hertfordshire, UK) e analisados em computador (PowerLab, ADInstruments).

As experiências foram efectuadas em conformidade com as recomendações do "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", publicado pelo National Institute of Health, e mediante aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa.

### **Estimulação eléctrica vagal**

Isolou-se o nervo vago cervical direito através de abordagem cirúrgica com incisão mediana do pescoço. Foi colocado um par de eléctrodos de platina envolvendo o nervo para estimulação bipolar, com isolamento por parafina semisólida e conexão a um estimulador eléctrico (Digitimer DS2A). O nervo vago foi estimulado (20 Hz, 0.2 ms, 150-200 mA) por forma a obter pausas sinusais significativas (>2.0 s), diminuição da frequência cardíaca >50% ou bloqueio aurículo-ventricular completo.

### **Protocolo electrofisiológico**

Os electrogramas foram registados com quatro eléctrodos monopolares (125- $\mu$ m Ag-AgCl, isolados com Teflon), colocados numa rede de nylon com espaçamento intereléctrodos de 4 mm e aplicados em posição epicárdica, da aurícula direita lateral-alta (AD) à aurícula esquerda lateral-alta (AE) (*Figura 1*). Um eléctrodo de ponta circular foi posicionado envolvendo o segmento proximal das VP esquerdas para estimulação e registo de electrogramas. A activação epicárdica foi registada em ritmo sinusal, com análise dos tempos de condução interauricular (entre a AD e a AE) e da AD até à despolarização das VP, em condições basais e durante estimulação vagal. Os electrogramas foram amplificados e filtrados de 0.5 a 300 Hz e de 30 a 250 Hz para registos monopolares e bipolares, res-

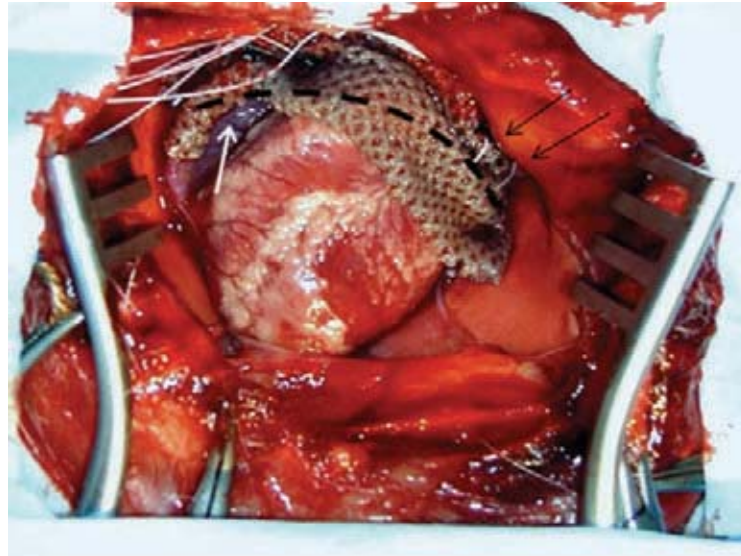
The experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health, and were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Lisbon University.

### **Electrical vagal stimulation**

The right cervical vagus nerve was isolated surgically with a median incision in the neck. A pair of platinum electrodes were placed around the nerve for bipolar stimulation, isolated with soft paraffin and connected to an electrical stimulator (Digitimer DS2A). The vagus nerve was stimulated (20 Hz, 0.2 ms, 150-200  $\mu$ A) in order to obtain significant sinus pauses (>2.0 s), >50% reduction of heart rate or complete atrioventricular block.

### **Electrophysiological protocol**

The electrograms were recorded with four monopolar electrodes (125- $\mu$ m Teflon-insulated Ag/AgCl), placed in a nylon mesh with 4 mm spacing and applied in epicardial position, from high lateral right atrium (RA) to high lateral left atrium (LA) (*Figure 1*). A circular electrode was placed around the proximal segment of the left PVs for stimulation and electrogram recording. Epicardial activation was recorded in sinus rhythm, and the interatrial conduction time (from RA to LA) and from RA to PV depolarization was measured in basal conditions and during vagal stimulation. The electrograms were amplified and filtered from 0.5 to 300 Hz and from 30 to 250 Hz for monopolar and bipolar recordings, respectively (Neurolog, Digitimer, UK). Stimulation to record the ERP was performed with a bipolar electrode (0.1 mm, silver with Teflon insulation) positioned with a micromanipulator (WPI, M330) and using an 8-channel stimulator (Digitimer DS2A). ERPs were analyzed at five different sites: the RA, right (RAA) and left (LAA) atrial appendages, LA and PVs. In stable conditions, the programmed stimulation protocol was begun, an extrastimulus being introduced during continuous bipolar pacing with a 300-ms cycle length (or 20 ms less than the RR



*Figura 1.* Preparação de tórax-aberto do coração de coelho, com rede de nylon suportando eléctrodos monopolares ao longo das aurículas (da aurícula direita lateral-alta até à aurícula esquerda lateral-alta). As setas escuras indicam dois eléctrodos com contacto epicárdico na aurícula esquerda. A seta branca indica a localização do apêndice auricular direito.

*Figure 1.* Open-chest preparation of rabbit heart, with a nylon mesh supporting monopolar electrodes along the atria, from high lateral right atrium to high lateral left atrium. The dark arrows indicate two electrodes in contact with the left atrial epicardium. The white arrow indicates the right atrial appendage.

pectivamente (Neurolog, Digitemer, UK). A estimulação para estudo dos períodos refractários (PRE) foi efectuada com eléctrodo bipolar (0.1 mm, prata com isolamento de teflon) posicionado com micromanipulador (WPI, M330) e recurso a um estimulador de 8 canais (Digitemer DS2A). Os PRE foram analisados em cinco locais diferentes (AD, apêndice auricular direito, apêndice auricular esquerdo, AE e VP). Em condições estáveis, procedeu-se a protocolo de estimulação programada, com um extra-estímulo durante  *pacing* bipolar contínuo com ciclo de 300 ms (ou 20 ms inferior ao intervalo RR para frequência cardíaca > 200 bpm). Utilizámos impulsos com duração de 2 ms e o dobro da intensidade do limiar de captura. O extra-estímulo foi introduzido com intervalo de acoplamento 100 ms inferior ao do ciclo de base, diminuindo-se depois em intervalos de 5 ms até atingir o PRE. O PRE foi definido como o intervalo S1-S2 mais longo com falha de despolarização local. A dispersão da refractariedade foi cal-

interval for a heart rate of >200 bpm), using impulses of 2 ms at twice the amplitude of the capture threshold, and with a coupling interval 100 ms shorter than the basal pacing cycle, which was then reduced in 5-ms steps until the ERP was reached. The ERP was taken as the longest S1-S2 interval that failed to initiate local depolarization, and dispersion of refractoriness was calculated as the difference between the longest and shortest ERP at the five sites assessed. Conduction times, ERPs and dispersion of refractoriness were analyzed in basal conditions and during vagal stimulation. To assess vulnerability to AF induction, high-frequency pacing (50 Hz, 10 s, suprathreshold intensity) was used with the bipolar electrode situated in the RAA, LAA and PVs, alone or combined with vagal stimulation. AF was defined as a rapid disordered atrial rhythm, with variable cycle length, polarity, configuration and amplitude, and lasting more than 5 cycles<sup>(13)</sup>. PVT was

culada como a diferença entre o PRE mais longo e o mais curto nos 5 locais avaliados. Os intervalos de condução, os PRE e a dispersão da refractariedade foram analisados em condições basais e durante estimulação vagal. Para avaliação da vulnerabilidade para indução de TVP e FA foi utilizado pacing de alta-frequência (50 Hz, 10 s, intensidade supralimiar), com eléctrodo bipolar posicionado no apêndice auricular direito (AAD), apêndice auricular esquerdo (AAE) e VP, isolado ou combinado com estimulação vagal. Definiu-se FA como um ritmo auricular rápido desordenado, com ciclo, polaridade, configuração e amplitude variáveis e duração superior a 5 ciclos<sup>(13)</sup>. A TVP foi caracterizada como um ritmo auricular regular com ciclo <200 ms e activação mais precoce nas VP.

### Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas sob a forma de média±desvio padrão e as variáveis categóricas em frequências e percentagens. As comparações foram efectuadas pelo teste t de Student para as variáveis contínuas. A análise comparativa dos valores dos PRE e intervalos de condução basais e durante estimulação vagal foi efectuada com o teste t de Student emparelhado. Para as variáveis categóricas usámos o teste de qui-quadrado, com correcção de Yates. Considerámos estatisticamente significativos os resultados com valor <0.05. O programa estatístico utilizado foi o GraphPAD (GraphPad Software, Inc., California, USA).

### RESULTADOS

Em condições estáveis, após preparação do animal, a frequência cardíaca média era de 187±29 bpm (170-240 bpm) e a PA sistólica 83±14 mmHg (65-95 mmHg). A duração da onda P variou entre 30 e 65 ms. A estimulação vagal causou bradicardia sinusal acentuada (<60 bpm), com pausas significativas (>2.0 s) e hipotensão arterial (<50 mmHg) em todos os animais.

defined as a regular atrial rhythm with a cycle length of <200 ms and earliest activation in the PVs.

### Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means ± standard deviation and categorical variables as frequencies and percentages. Comparisons were made using the Student's t test for continuous variables. Values for ERPs and conduction times, in basal conditions and during vagal stimulation, were compared with the paired Student's t test. The chi-square test with Yates correction was used for categorical variables. Results with p<0.05 were considered significant. The statistical package used was GraphPad (GraphPad Software Inc., California, USA).

### RESULTS

After the animals were prepared and stabilized, mean heart rate was 187±29 bpm (170-240 bpm) and systolic BP was 83±14 mmHg (65-95 mmHg). P wave duration varied between 30 and 65 ms. Vagal stimulation caused marked sinus bradycardia (<60 bpm), with significant pauses (>2.0 s) and arterial hypotension (<50 mmHg), in all animals.

### Atrial and pulmonary vein refractoriness and conduction

In basal conditions, conduction times were 16±8 ms (8-21 ms) between RA and LA and 43±30 ms (16-80 ms) between RA and PVs (p=0.008). During vagal stimulation they were 27±16 ms (20-50 ms) and 50±10 ms (43-58 ms), respectively (p=0.004 for the basal vs. vagal RA-LA time; p=NS for the basal vs. vagal RA-PV time) (*Figure 2*). Table I shows the values for ERPs obtained in basal conditions and during vagal stimulation. In basal conditions, there was increased refractoriness of RA and RAA to LAA and LA (89±24 and 78±17 ms vs. 104±18 and 110±26 ms, respectively; p<0.05). The PV ERPs were shorter than those measured in LA and LAA (p=0.04), but without significant

|     | Basal      | Estimulação vagal | p      |
|-----|------------|-------------------|--------|
| AD  | 89±24 ms   | 66±21 ms          | 0.01   |
| AAD | 78±17 ms   | 63±21 ms          | 0.06   |
| AAE | 104±18 ms* | 76±13 ms          | <0.001 |
| AE  | 110±26 ms* | 80±27 ms *        | 0.03   |
| VP  | 65±42 ms   | 38±30 ms          | <0.01  |

Tabela I – Períodos refractários efectivos (PRE) avaliados em condições basais e durante estimulação vagal. AD=aurícula direita lateral-alta; AAD=apêndice auricular direito; AAE=apêndice auricular esquerdo; AE=aurícula esquerda lateral-alta; VP=veias pulmonares esquerdas. \*- p<0.05 (PRE do AAE e AE vs. AD, AAD e VP em basal e PRE da AE vs. VP com estimulação vagal)

|     | Basal      | Vagal stimulation | p      |
|-----|------------|-------------------|--------|
| RA  | 89±24 ms   | 66±21 ms          | 0.01   |
| RAA | 78±17 ms   | 63±21 ms          | 0.06   |
| LAA | 104±18 ms* | 76±13 ms          | <0.001 |
| LA  | 110±26 ms* | 80±27 ms *        | 0.03   |
| PV  | 65±42 ms   | 38±30 ms          | <0.01  |

Table I. Effective refractory periods assessed in basal conditions and during vagal stimulation. RA: high lateral right atrium; RAA: right atrial appendage; LAA: left atrial appendage; LA: high lateral left atrium; PV: left pulmonary veins. \*: p<0.05 (LAA and LA ERPs vs. RA, RAA and PV in basal conditions and LA vs. PV ERPs during vagal stimulation)

### Refractariedade e condução nas aurículas e veias pulmonares

Em condições basais, os intervalos de condução eram de 16±8 ms (8-21 ms) entre a AD e a AE e de 43±30 ms (16-80 ms) entre a AD e VP (p=0.008). Durante estimulação vagal foram de, respectivamente, 27±16 ms (20-50 ms) e 50±10 ms (43-58 ms), (p=0.004 para o intervalo AD-AE basal vs. vagal; p=NS para intervalo AD-VP basal *versus* vagal) (*Figura 2*). A tabela I mostra os valores dos PRE obtidos em basal e durante estimulação vagal. Em basal, regista-se um aumento na refractariedade da AD e AAD para o AAE e AE (89±24 ms e 78±17 ms vs 104±18 ms e 110±26 ms, respectivamente; p <0.05). As VP mostraram PRE mais curtos em comparação com o AAE e AE (p=0.04), mas não significativamente diferentes da AD e AAD. A estimulação vagal causou uma redução consistente, significativa dos PRE na AD, AAE, AE e VP, registando-se uma tendência para valores mais baixos no AAD (78±17 ms *versus* 63±21 ms, p=0.06), mantendo diferenças estatisticamente significativas entre a AE e as VP. Os valores da dispersão da refractariedade não se modificaram significativamente durante a estimulação vagal aguda (38±17 ms *versus* 28±22 ms na dispersão dos PRE auriculares, p=NS e 60±26 ms *versus* 66±20 ms na dispersão dos PRE das aurículas + VP, p=NS).

differences compared to RA and RAA. Vagal stimulation caused a consistent and significant reduction in ERPs in RA, LAA, LA and PVs, with a trend for lower values in RAA (78±17 vs. 63±21 ms, p=0.06) and statistically significant differences between LA and PVs. Dispersion of refractoriness did not change significantly during acute vagal stimulation (38±17 vs. 28±22 ms in dispersion of atrial ERPs, p=NS, and 60±26 vs. 66±20 ms in dispersion of atrial + PV ERPs, p=NS).

### Inducibility of pulmonary vein tachycardia and atrial fibrillation

AF induction was induced in 45% of cases with 50 Hz bursts applied in the RAA and PVs. In the LAA, AF could not be induced with high-frequency pacing alone. During vagal stimulation, AF induction was reproducible in 100%, 64% and 18% of rabbits with pacing in the RAA, PVs and LAA, respectively (RAA vs. LAA, p<0.05). In three animals, AF was induced with an extrastimulus combined with vagal stimulation during assessment of ERPs in the RAA. The duration of inducible AF varied from 1.0±0.2 s with 50 Hz pacing to 12.0±4.5 s with 50 Hz combined with vagal activation (p<0.01) (*Figure 3*). Regular PVT (80-90 ms cycle length), with fibrillatory conduction resulting in AF, was



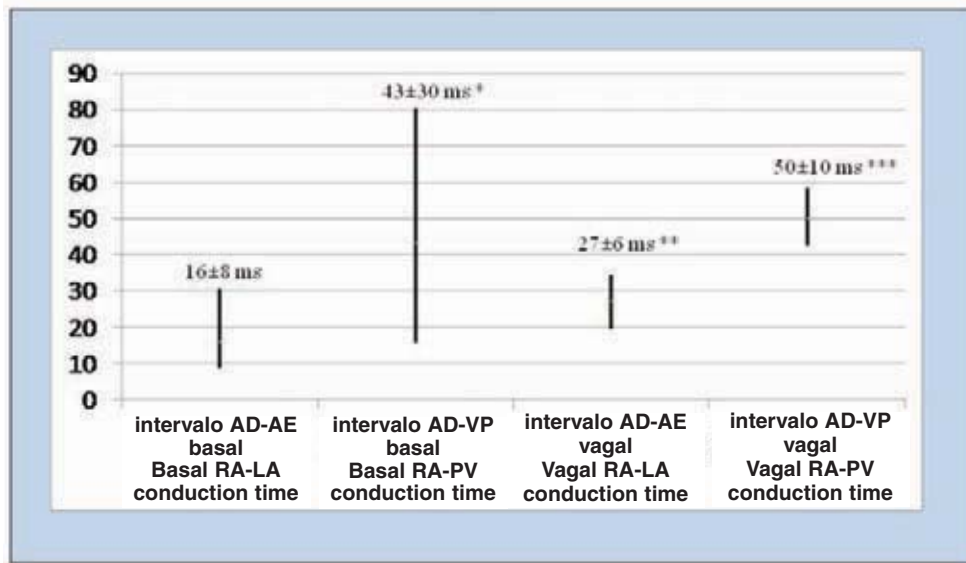


Figura 2. intervalos de condução em ritmo sinusal entre a aurícula direita lateral-alta (AD) e a aurícula esquerda lateral-alta (AE) e entre a AD e as veias pulmonares esquerdas (VP) em condições basais e durante estimulação vagal (vagal). \*= AD-AE basal vs. AD-VP basal,  $p=0.008$ ; \*\*=AD-AE basal vs. AD-AE vagal,  $p<0.05$ ;\*\*\*=AD-VP vagal vs. AD-VP vagal,  $p=NS$

Figure 2. Conduction times in sinus rhythm between high lateral right atrium (RA) and high lateral left atrium (LA), and between RA and the left pulmonary veins (PV), in basal conditions and during vagal stimulation.

\*: basal RA-LA vs. basal RA-PV,  $p=0.008$ ; \*\*: basal RA-LA vs. vagal RA-LA,  $p<0.05$ ;\*\*\*: basal RA-PV vs. vagal RA-PV,  $p=NS$ .

### Inducibilidade de taquicardia das veias pulmonares e fibrilhação auricular

Induziu-se FA, de forma intermitente, em 45% dos coelhos com bursts de 50Hz aplicados no AAD e VP. No AAE, com pacing de alta-frequência isolado não foi possível induzir FA. Durante a estimulação vagal, induziu-se FA, de modo reprodutível, em 100%, 64% e 18% dos coelhos com pacing no AAD, VP e AAE, respectivamente (AAD versus AAE,  $p<0.05$ ). Em três animais, a FA foi iniciada com um extra-estímulo combinado com estimulação vagal durante a avaliação do PRE no AAD. A duração da FA variou de curtos períodos com  $1.0\pm 0.2$  s, induzidos por estimulação com 50Hz, até episódios com  $12.0\pm 4.5$  s, em resposta à estimulação a 50Hz combinada com ativação vagal ( $p<0.01$ ) (Figura 3). Induziu-se TVP regular (ciclo de 80-90 ms), com condução fibrilhatória resultando em FA, de modo reprodutível, com estimulação vagal e pacing de alta-frequência no AAD e VP (Figura 4). Durante estimulação vagal, a TVP e a FA tiveram duração  $>10$  s em 45% dos

induced reproducibly by vagal stimulation and 50 Hz pacing in the RAA and PVs (Figure 4). During vagal stimulation, PVT and AF lasted  $>10$  s in 45% of rabbits, and ceased immediately after discontinuation of vagal stimulation in 80% of cases.

### DISCUSSION

The present study analyzes the effects of vagal stimulation on the electrophysiological properties of the atria and PVs and on vulnerability to induction of PVs tachycardia and AF in an *in vivo* rabbit heart model. We characterized the influence of acute stimulation of the right cervical vagus nerve on electrical conduction and parameters of atrial and PVs refractoriness, and showed that vagal activity can contribute to the induction and duration of AF.

Our results indicate a significant conduction delay in sinus rhythm between the atria and the PVs. Mean conduction time from

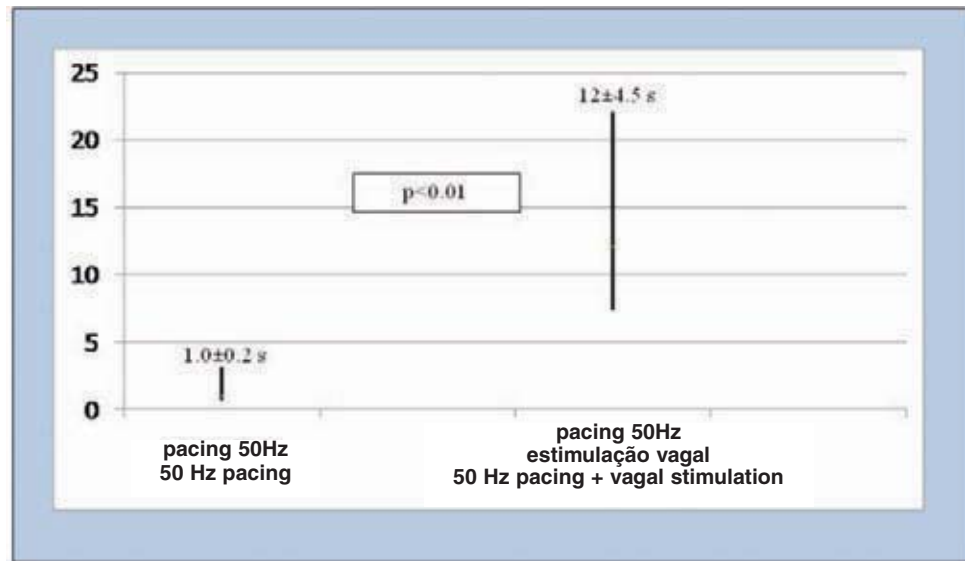


Figura 3. Duração média da fibrilhação auricular induzida com estimulação rápida isolada (pacing 50 Hz) e em resposta à estimulação rápida combinada com activação vagal (pacing 50Hz + estimulação vagal)

Figure 3. Mean duration of atrial fibrillation induced by high-frequency stimulation (50 Hz pacing) alone and in response to high-frequency stimulation combined with vagal stimulation.

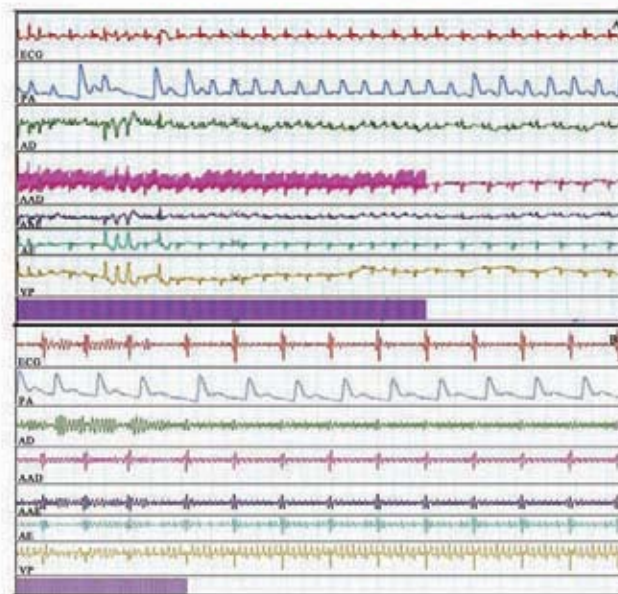


Figura 4. Registo mostrando estimulação do apêndice auricular direito (AAD) com 50Hz, sem indução de arritmia (A) e episódio de taquicardia das veias pulmonares (VP), com ciclo de 80 ms, resultando em fibrilhação auricular, induzido por estimulação no mesmo local com 50Hz em combinação com activação vagal (B). (ECC=electrocardiograma – derivação “DI-like”; PA=pressão arterial, AD=aurícula direita lateral-alta; AAD=apêndice auricular direito; AAE=apêndice auricular esquerdo; AE=aurícula esquerda lateral-alta; VP=veias pulmonares esquerdas)

Figure 4. Trace showing stimulation of right atrial appendage at 50 Hz, with no induction of arrhythmia (A) and an episode of pulmonary vein tachycardia with an 80-ms cycle length, resulting in atrial fibrillation induced by stimulation at 50 Hz at the same site combined with vagal activation (B).

ECC: electrocardiogram – “DI-like” lead; PA: blood pressure, AD: high lateral right atrium; AAD: right atrial appendage; AAE: left atrial appendage; AE: high lateral left atrium; VP: left pulmonary veins

coelhos, interrompendo-se imediatamente após suspensão da estimulação vagal em 80% dos casos.

## DISCUSSÃO

O presente estudo analisa o impacto da estimulação vagal em propriedades electrofisiológicas auriculares e das VP e na vulnerabilidade para indução de TVP e FA no modelo de coração de coelho *in vivo*. Caracterizámos a influência da estimulação aguda directa do nervo vago cervical direito na condução eléctrica e parâmetros da refractariedade auricular e das VP e mostrámos que a actividade vagal pode contribuir para a indução e duração de episódios de FA.

Os resultados apontam para um atraso significativo da condução, em ritmo sinusal, entre as aurículas e as VP. De facto, o tempo médio de activação da AD às VP foi cerca de 2 a 2,5 vezes superior ao intervalo de condução interauricular, durante estimulação vagal e em condições basais, respectivamente (*Figura 2*). Tem sido aceite que a condução entre VP e aurículas pode ser essencial para que a actividade rápida focal das VP desencadeie episódios de FA<sup>(15,16)</sup>, sendo provável que haja interacção entre as VP e as aurículas dependendo de condução bidireccional, em que a TVP mantenha a FA e a actividade das aurículas contribua para iniciar TVP. Neste estudo, a estimulação vagal, facilitou a indução de TVP com pacing rápido do AAD e a TVP manteve condução fibrilhatória para as aurículas, o que revela capacidade de condução rápida bidireccional. Apesar do aumento verificado na condução interauricular, não houve diferenças significativas no tempo de activação entre a AD e as VP, sugerindo um padrão não uniforme na resposta à activação vagal, com impacto diferente nos atrasos de condução eléctrica. Além disso, a presença de propriedades anisotrópicas na condução ao nível da junção VP-AE pode contribuir para promover fenómenos de reentrada local desempenhando um papel como substrato na manutenção de FA<sup>(17)</sup>.

RA to PVs was 2 to 2.5 times greater than interatrial conduction times both during vagal stimulation and in basal conditions (*Figure 2*). It is accepted that conduction between PVs and atria may be essential for rapid focal activity in the PVs to trigger AF<sup>(15, 16)</sup>; there is probably interaction between the PVs and the atria dependent on bidirectional conduction, in which PVT sustains AF and atrial activity is a factor in the onset of PVT. In the present study, vagal stimulation induced PVT with rapid pacing in the RAA and the PVT sustained fibrillatory conduction to the atria, revealing the presence of rapid bidirectional conduction. Although interatrial conduction increased, there were no significant changes in conduction time between the RA and the PVs, which suggests that the response to vagal stimulation is not uniform, affecting conduction delay in different ways. In addition, the presence of anisotropic conduction properties at the PV-LA junction may contribute to local reentrant phenomena, acting as a substrate for maintenance of AF<sup>(17)</sup>.

The significant differences in ERPs between RA, LA and VPs suggest that refractoriness is heterogeneous at the sites assessed, both in basal conditions and during vagal stimulation. Shortening of ERPs, associated with changes in atrial conduction velocity during vagal activation, led to a decrease in wavelength (conduction velocity x ERP), influencing the number of wavelets that can coexist in atrial tissue at any one time and creating favorable conditions for induction and maintenance of AF. The shorter ERPs in the PVs, RA and RAA may explain the greater inducibility of AF with high-frequency pacing at these sites. In this model, consistent induction of PVT at sites with shorter ERPs, and maintenance of the arrhythmia only during vagal stimulation, suggest that local refractoriness and rapid PV activation are influenced by fluctuations in vagal tone. Arora et al. demonstrated that vagal stimulation causes greater reduction in ERPs in the PVs than in the LAA<sup>(18)</sup>. A combination of factors, including shorter PV ERPs, fibrillatory conduction between PVs and atria and

As diferenças significativas dos PRE entre a AD, AE e VP sugerem um perfil heterogêneo da refratariedade nos locais avaliados, quer em condições basais quer durante estimulação vagal. O encurtamento dos PRE, associado às modificações na velocidade de condução auricular durante a activação vagal, contribui para um menor comprimento de onda (“wavelength”=velocidade de condução\*PRE), influenciando o número de ondas (“wavelets”) que podem coexistir no tecido auricular num determinado período de tempo e criando condições favoráveis para a indução e manutenção da FA. Os PRE mais curtos nas VP, AD e AAD podem justificar a maior inducibilidade de FA com pacing de alta-frequência nestes locais. Neste modelo, a indução consistente de TVP em sítios com menor PRE e a manutenção da arritmia somente durante a estimulação vagal sugerem que a refratariedade local e a actividade rápida das VP são influenciadas por flutuações do tónus vagal. Arora et al, demonstraram também que a estimulação vagal causa maior redução dos PRE nas VP do que no AAE<sup>(18)</sup>. A combinação de factores como PRE mais curtos das VP, a condução “fibrilhatória” entre VP e aurículas e a heterogeneidade dos PRE das aurículas favorecem a ocorrência de mecanismos de reentrada local e múltiplas ondas de despolarização auriculares, contribuindo para a FA mediada pelo vago. Recentemente, Tanami et al propuseram que a actividade vagal possa desempenhar um papel no início da FA através da modulação da activação focal repetitiva (*trigger*) das VP e na manutenção da FA, ao contribuir para o substrato electrofisiológico do tecido auricular<sup>(19)</sup>.

Em animais, a estimulação do nervo vago e a infusão de acetilcolina encurtam os PRE mais na AD que na AE, o que se atribui à distribuição não uniforme das terminações nervosas<sup>(20)</sup>. As propriedades electrofisiológicas que influenciam a génese da FA incluem alterações da condução auricular, o encurtamento dos PRE e a dispersão da refratariedade<sup>(21)</sup>. No nosso estudo, apesar das diferenças significativas na condução interauricular e do encurtamento dos PRE

heterogeneity of atrial ERPs, promotes local reentrant phenomena and multiple atrial depolarization wavelets, contributing to vagally mediated AF. Horikawa-Tanami et al. have recently proposed that vagal stimulation may play a role in AF onset by modulating repetitive focal activation acting as a trigger in the PVs, and in AF maintenance by contributing to the electrophysiological substrate of atrial tissue<sup>(19)</sup>.

In animal models, vagus nerve stimulation and acetylcholine infusion shorten ERPs more in the right than in the left atrium, which is attributed to non-uniform distribution of nerve endings<sup>(20)</sup>. The electrophysiological properties that influence the genesis of AF include alterations in atrial conduction, shortening of ERPs and dispersion of refractoriness<sup>(21)</sup>. In our study, although there were significant differences in interatrial conduction and shortening of ERPs during vagal stimulation, we did not observe any change in dispersion of refractoriness, which is considered an important factor in the maintenance or termination of AF episodes<sup>(10, 22)</sup>. This may explain our inability to sustain AF despite vagal stimulation, the induced AF lasting for >10 s in only 45% of cases. However, vagal activation did promote AF induction, and significantly influenced the duration of episodes. In a recent work in humans, we showed that the induction of self-limited AF lasting <1 min, and of sustained AF, were associated with similar increases in dispersion of refractoriness<sup>(23)</sup>. It is likely that different variables, including sympathetic-parasympathetic balance, pressure-volume overload stimulating stretch receptors in segments of the atria and PVs, or other electrophysiological characteristics, also contribute to AF maintenance.

Repeated induction of AF and PVT with high-frequency pacing at sites with the shortest ERPs suggests that, besides vagal stimulation, rapid focal activation is another condition for initiation of AF. As was demonstrated in humans, PV activity also appears to be involved in the initiation and maintenance of AF in this model.

In recent years, animal experiments have

durante a estimulação vagal, não se documentaram modificações na dispersão da refractariedade, que tem sido referida como um factor importante na manutenção ou interrupção dos episódios de FA<sup>(10, 22)</sup>. Isto pode explicar a impossibilidade em perpetuar a FA apesar da activação vagal. De facto, a FA induzida durante estimulação vagal só teve duração >10 s em 45% dos animais. No entanto, a activação vagal facilitou a indução de FA e influenciou significativamente a duração dos episódios da arritmia. Num trabalho recente em humanos, mostrámos que a indução de FA auto-limitada com duração <1mn e a de FA mantida se associavam a aumentos semelhantes na dispersão da refractariedade<sup>(23)</sup>. É provável que diferentes variáveis, incluindo o balanço simpático-parassimpático, a sobrecarga de volume-pressão, com estimulação de receptores de estiramento em segmentos das aurículas e VP ou outras características electrofisiológicas possam contribuir também para a manutenção da FA.

A indução repetida de FA e TVP com *pacings* de alta-frequência em locais com PRE mais curtos, sugere que, além da estimulação vagal, a actividade focal rápida é outra condição para o início de FA. Tal como demonstrado em humanos, também neste modelo a actividade das VP parece estar envolvida no início e manutenção da FA.

Nos últimos anos, a experimentação envolvendo modelos animais tem procurado obter informação relativa aos mecanismos básicos subjacentes à fisiopatologia da FA. No entanto, o desenvolvimento de modelos que permitam estudar a influência autonómica nas propriedades electrofisiológicas do coração e sua relação com a génese de arritmias permanece um importante desafio, estando por esclarecer o papel dos efeitos da actividade vagal na recorrência espontânea de FA e na progressão para uma situação de arritmia mantida.

O presente modelo do coração de coelho *in vivo*, permitiu desenvolver uma metodologia de trabalho que obtem alterações reprodutíveis nas propriedades electrofisiológicas das aurículas e VP, facilitando a indução e duração de FA na presença de estimulação vagal.

sought to elucidate the basic mechanisms underlying the pathophysiology of AF. However, the development of models with which to study autonomic influence on the electrophysiological properties of the heart and their relation to arrhythmogenesis remains a considerable challenge. The role of vagally mediated effects in spontaneous recurrence of AF, and in progression to a sustained arrhythmia, is still poorly understood.

With the *in vivo* rabbit heart model presented, we have developed a methodology for obtaining reproducible alterations in the electrophysiological properties of the atria and PVs, promoting the induction and maintenance of AF in the presence of vagal stimulation.

## STUDY LIMITATIONS

One limitation is that the model does not include information on the sympathetic component of autonomic activity. However, the scope of the study was to assess the effects of vagal stimulation on conduction and refractoriness in the atria and PVs and vulnerability to AF induction and maintenance. Furthermore, vagal stimulation has been associated with shortening of ERPs and AF inducibility and maintenance in other animal models<sup>(24, 25)</sup>, while sympathetic stimulation is considered less important in ERP heterogeneity and AF induction<sup>(26)</sup>. Another limitation of the protocol is that assessment of electrophysiological properties was at the epicardial level, and not all the PVs were included, and so the results cannot be extrapolated to the response that might be obtained at the endocardial level of the atria and PVs, or at other sites in the PVs. Finally, the weak tendency of rabbit atria to fibrillate and to sustain the arrhythmia, due to their small size, should be taken into account when considering the concept of sustained AF in this preparation. Further studies with this model will help elucidate the effects of autonomic innervation and activation on the dynamics of recurrent AF.

### Limitações do estudo

Uma das limitações diz respeito ao facto da preparação não incluir informação relativa ao componente simpático da actividade autonómica. No entanto, o estudo foi realizado no âmbito da avaliação dos efeitos da estimulação vagal na condução e refractariedade das aurículas e VP e no impacto na indutibilidade e manutenção de FA. Por outro lado, a estimulação vagal tem sido associada ao encurtamento dos PRE e à indutibilidade e manutenção de FA noutros modelos animais<sup>(24,25)</sup>, enquanto a estimulação da actividade simpática tem sido considerada como tendo menos influência na heterogeneidade dos PRE e promoção de FA<sup>(26)</sup>. Outra das limitações do protocolo, está relacionada com a avaliação de propriedades electrofisiológicas a nível epicárdico, sem incluir determinações em todas as VP. Deste modo, os resultados não podem ser extrapolados para o tipo de resposta obtida na vertente endocárdica das aurículas e VP, nem para diferentes locais das VP. Finalmente, a baixa tendência das aurículas do coelho para fibrilhar e manter a arritmia, devido às suas pequenas dimensões, condiciona o conceito de FA mantida nesta preparação. Estudos futuros com este modelo poderão contribuir para elucidar o impacto da inervação e actividade do SNA na dinâmica dos episódios recorrentes de FA.

### CONCLUSÕES

Os efeitos da estimulação aguda vagal cervical nas propriedades de condução e refractariedade das aurículas e VP foram caracterizados neste modelo do coração de coelho *in vivo*, com inervação autonómica preservada. Os resultados mostram que a actividade vagal se associa ao aumento da condução interauricular e diminuição dos PRE em vários locais auriculares e nas VP. Esta preparação permite também avaliar o impacto da estimulação vagal na indutibilidade de FA e sua contribuição para a duração da arritmia. Os nossos dados suportam que o desenvolvimento deste modelo experimental de estimulação vagal pode fornecer informação importante no estudo da influência da actividade autonómica nos mecanismos fisiopatológicos da FA.

### CONCLUSIONS

The effects of acute cervical vagus nerve stimulation on atrial and pulmonary vein conduction and refractoriness were assessed in an *in vivo* rabbit heart model with intact autonomic innervation. The results show that vagal activity is associated with increased interatrial conduction and shortening of effective refractory periods at various sites in the atria and the PVs. This preparation also enables assessment of the effects of vagal stimulation on the inducibility and duration of AF. Our findings suggest that this experimental model of vagal stimulation can provide valuable information concerning the influence of autonomic activity on the pathophysiological mechanisms of AF.

Pedido de separatas:

Address for reprints:

Mário Oliveira

Serviço de Cardiologia, Hospital de Santa Marta

Rua Santa Marta

1169-024, Lisboa - Portugal

Telefone:351.213594311

Fax: 351213560368

m.martinsoliveira@gmail.com

## BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, et al. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol.* 1998;82:2-9.
2. Friberg J, Scharling H, Gadsbøll N, Jensen GB. Sex-specific increase in the prevalence of atrial fibrillation (The Copenhagen City Heart Study). *Am J Cardiol.* 2003 Dec 15;92(12):1419-23
3. Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation - very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:51-77
4. M. Haissaguerre, P. Jais, D.C. Shah. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins, *N Engl. J Med.* 1998, 339, pp. 659-666
5. Tai CT. Role of autonomic influences in the initiation and perpetuation of focal atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2001 Mar;12(3):292-3
6. Bettoni M, Zimmermann M. Autonomic tone variations before the onset of paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2002;105:2753-2759
7. Amar D, Zhang H, Miodownik S, Kadish AH. Competing autonomic mechanisms precede the onset of postoperative atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1262-8
8. Coumel P, Attuel P, Lavalée J, Flammang D, Leclercq JF, Slama R. The atrial arrhythmia syndrome of vagal origin. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1978, 71, 645-656
9. Chen J, Wasmund SL, Hamdan MH. Back to the Future: The Role of the Autonomic Nervous System in Atrial Fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2006; 29:413-421
10. Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol* 1997; 273:H805-H816
11. Sharifov OF, Fedorov VV, Beloshapko GG, Glukhov AV, Yushmanova V, Rosenshtraukh L. Roles of adrenergic and cholinergic stimulation in spontaneous atrial fibrillation in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:483-490
12. Coumel P. Autonomic influences in atrial tachyarrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*, October 1996; vol 7(10): 999-1007
13. Hirose M, Leatmanorath Z, Laurita R, Carlson D. Partial vagal denervation increases vulnerability to vagally induced atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2002;13:1272-1279
14. Oral H, Özyaydin M, Tada H, et al. Mechanistic Significance of Intermittent Pulmonary Vein Tachycardia in Patients with Atrial Fibrillation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 2002, Volume 13 Issue 7:645-650
15. Nakagawa H, Aoyama H, Beckman KJ, Po SS, Wu R, Lockwood D, Spector P, et al. Relation between pulmonary vein firing and extent of left atrial-pulmonary vein connection in patients with atrial fibrillation. *Circulation* 109: 1523-1529, 2004
16. Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable micro re-entrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation.* 2000; 101:194-199
17. Kumagai K, Ogawa M, Noguchi H, et al. Electrophysiologic properties of pulmonary veins assessed using a multielectrode basket catheter. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43;12: 2281-2289
18. Arora R, Ng J, Ulphani J, Mylonas I, Subacius H, Shade G, et al. Unique autonomic profile of the pulmonary veins and posterior left atrium. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 1340-8
19. Horikawa-Tanami T, Hirao K, Furukawa T, Isobe M. Mechanism of the Conversion of a Pulmonary Vein Tachycardia to Atrial Fibrillation in Normal Canine Hearts: Role of Autonomic Nerve Stimulation. *J Cardiovasc Electrophysiol*, May 2007 Vol. 18:534-541
20. Zipes DP, Mihalick MJ, Robbins GT. Effects of selective vagal and stellate ganglion stimulation on atrial refractoriness. *Cardiovasc Res* 1974;8:647-55
21. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, et al. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation.* 2006 Aug 15;114(7):257-354
22. Rahme MM, Cotter B, Leistad E, et al. Persistence of Atrial Fibrillation After Its Induction-Importance of the Duration and Dispersion of Atrial Refractoriness and Electrical Remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1999 Apr ;4 (2):113-120
23. Oliveira M, da Silva MN, Timoteo AT, Feliciano J, Sousa L, Santos S, Silva-Carvalho L, Ferreira R. Inducibility of atrial fibrillation during electrophysiologic evaluation is associated with increased dispersion of atrial refractoriness. *Int J Cardiol.* 2009, Vol 136 (2):130-135.
24. Wilber D, Morton J. Vagal Stimulation and Atrial Fibrillation: Experimental Models and Clinical Uncertainties. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002, Vol. 13, 1280-1282
25. Lemola K, Chartier D, Yeh YH, et al. Pulmonary Vein Region Ablation in Experimental Vagal Atrial Fibrillation: Role of Pulmonary Veins vs. Autonomic Ganglia. *Circulation.* 2008;117:470-77
26. Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *American Journal of Physiology* 1997, vol. 42, 2:805-816