

Artigo

Medida da capacidade de difusão: técnicas Measurement of diffusing capacity: techniques

Maria Izabel Veiga dos Santos¹, Karen Rosas Sodré Azevedo²

Resumo

A medida da capacidade de difusão traz informações adicionais importantes na avaliação de trocas gasosas em diversas doenças pulmonares. Neste capítulo iremos descrever a técnica de respiração única (DLCOsb), com ênfase na mais moderna, que utiliza analisadores rápidos (RGA), presente nos modelos mais novos de equipamentos de função pulmonar.

Descritores: capacidade de difusão, testes de função pulmonar, analisadores rápidos de gases.

Abstract

The measurement of diffusing capacity brings important additional information in the evaluation of gas exchange in several pulmonary diseases. In this chapter we will describe the single breath technique (DLCOsb), with an emphasis on the most modern, which uses fast analyzers (RGA), present in newer models of pulmonary function equipment.

Keywords: diffusion capacity, pulmonary function tests, rapid gases analysers

1. Pneumologista do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IDT/UFRJ), Brasil.

2. Doutora em Clínica Médica pela UFRJ. Pneumologista do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IDT/UFRJ), Brasil.

Endereço para correspondência: Rua Marquês de Olinda 64, apto. 304, bloco A, Botafogo, 22251-40, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Email: bebelveiga01@gmail.com

Considerações gerais

A medida da capacidade de difusão pulmonar foi inicialmente descrita por Marie Krogh em 1914, para explicar as trocas gasosas entre os alvéolos e o leito capilar pulmonar¹. Forster e colaboradores descreveram uma modificação na técnica de Krogh e usaram o hélio como gás traçador na mistura do gás². Desde então, várias modificações na técnica foram desenvolvidas.

A difusão é uma medida de transferência de um gás de uma área de alta pressão parcial para uma área de baixa pressão até atingir o equilíbrio. O gás utilizado para esta medida é o monóxido de carbono (CO), um gás que tem grande afinidade pela hemoglobina e que praticamente inexistente no sangue. Mede-se a transferência do CO do gás inspirado para o capilar pulmonar, usando um gás traçador inerte não difusível para determinar o volume alveolar (VA) e a concentração alveolar do CO. Os equipamentos mais antigos, que usam a técnica clássica de medida da capacidade de difusão pulmonar (DLCO) ainda são amplamente usados, principalmente no nosso meio e provavelmente ainda estarão em uso por um longo período. Os analisadores de CO nestes equipamentos têm algumas limitações que serão descritas na técnica. Esses equipamentos usam o hélio como gás traçador. Os equipamentos mais modernos usam analisadores de gases de resposta rápida (*rapidly responding gas analyser* - RGA), onde a análise é contínua em toda a amostra exalada, que chamaremos de técnica RGA e usam o metano como gás traçador. Este método nos fornece medidas mais confiáveis da DLCO. Na Europa, o termo mais usado é fator de transferência (TLCO) e nos Estados Unidos (EUA) capacidade de difusão pulmonar (DLCO).

Um novo consenso da *European Respiratory Society* (ERS) e da *American Thoracic Society* (ATS) foi publicado em 2017, com dois objetivos: 1) padronização da técnica pelos sistemas RGA, comparando com a técnica clássica; e 2) prover novos cálculos para incorporar uma análise contínua da amostra³. Em 2005, já havia sido publicado um consenso da ERS/ATS sobre a técnica clássica, cujas recomendações permanecem válidas⁴. Falaremos somente da técnica da difusão da respiração única (DLCOsb), por ser a técnica mais usada em todo mundo.

Metodologia

1. Determinação da DLCO

O volume de CO no espaço alveolar é o produto do volume alveolar (VA) e a fração alveolar de CO (FACO). Com um volume constante, a transferência de CO do pulmão para o sangue é: $VA \times \Delta FACO / \Delta T$. Na ausência de CO no sangue, a transferência de CO é igual ao produto da pressão alveolar de CO (PACO) e da DLCO.

2. Unidades da medida (DLCO em valor absoluto)

Na Europa: $\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ e nos EUA: $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$. O fator de correção entre a medida europeia e a americana é a multiplicação da 1ª por 2.987.

3. Determinantes das trocas gasosas

A capacidade do pulmão para fazer as trocas gasosas através da interface alvéolo-capilar é determinada pelas propriedades estruturais e funcionais:

- Propriedades estruturais: volume do gás, extensão da superfície de troca, espessura da membrana alvéolo-capilar e volume de hemoglobina (Hb).
- Propriedades funcionais: uniformidade da ventilação/perfusão, composição do gás alveolar, características de difusão da membrana, propriedade de ligação da Hb no capilar alveolar e tensão de CO e O₂ no capilar alveolar.

4. Etapas do processo de transferência do CO para o capilar pulmonar

Durante o teste para a medida da DLCO, várias etapas se seguem, como mostrado a seguir:

- Liberação do CO para as vias aéreas e espaço alveolar;
- Mistura e difusão do CO nos ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos;
- Transferência do CO da forma gasosa para líquida na interface da membrana alveolar;
- Difusão através da membrana das hemácias para o seu interior;
- Reação química com a hemoglobina.

O processo de difusão pode ser simplificado em 2 propriedades de transferência ou condutância: condutividade da membrana (Dm) e ligação do CO com a Hb (determinado pelo produto da reação química COHb (Θ), e o volume sanguíneo capilar alveolar (Vc)).

Desta forma: $1/\text{DLCO} = 1/\text{Dm} \times 1/\Theta\text{Vc}$

5. Analisador de gás

Para a técnica clássica da DLCO, somente a relação do CO inalado para o alvéolo e a concentração do gás traçador são necessários, sendo esta uma medida estática. Nos sistemas novos com analisadores de resposta rápida (RGA), existe um pequeno atraso de tempo decorrente da passagem do gás através dos tubos até o analisador, e o tempo de resposta deste. Por isto, o tempo de resposta do analisador irá determinar a acurácia da medida (análise verdadeira). É sempre muito importante analisar as especificações de linearidade do analisador dos equipamentos disponíveis. O volume de espaço morto do equipamento deve também ser conhecido. Em adultos, o espaço morto até o ponto de análise da amostra (todo o circuito), somado ao do filtro e peça bucal deve ser menor

que 200 ml.

6. Etapas do teste:

- **Condição do paciente:** fatores que afetam o Vc (exercício, posição do corpo, afinidade da hemoglobina pelo CO e nível de carboxihemoglobina) devem ser padronizados. Os pacientes que usam oxigênio suplementar devem suspendê-lo 10 minutos antes do exame. O tabagismo deve ser suspenso no dia do exame, por causa da interferência da carboxihemoglobina na medida. O valor da hemoglobina deve ser inserido no programa para a correção da capacidade de difusão pulmonar (DLCO adj). Na ausência de história recente de sangramento, aceita-se uma hemoglobina coletada até 10 dias antes do exame.

- **Manobra inspiratória:** iniciar o exame, respirando calmamente, até o volume corrente ficar estável. Fazer uma expiração não forçada até o volume residual (VR). No paciente obstrutivo, a manobra de expiração é mais prolongada, mas não deve exceder 12s. A seguir, o paciente inala rapidamente (tempo inspiratório máximo de 4s) até a capacidade pulmonar total (CPT). Um volume inspirado (VI) submáximo pode afetar a DLCO. O VI deve ser, no mínimo, 90% da capacidade vital (CV). Um VI de 85% pode ser aceito, desde que o VA desta medida esteja dentro de 200 ml ou 5% (o que for maior) do maior VA obtido nas manobras aceitáveis. Um tempo inspiratório prolongado irá reduzir o tempo de apneia inspiratória, reduzindo a DLCO.

- **Apneia inspiratória e manobra expiratória:** a apneia inspiratória deve ser de 10 ± 2 s. Tanto a técnica de Ogilvie⁵ (do início da inspiração até o início da coleta do gás alveolar) quanto a de Jones-Meade⁶ (início após 30% do gás inalado até a coleta de 50% da amostra alveolar) podem ser usados para a apneia inspiratória. A técnica de Jones-Meade é a mais usada. Durante a apneia inspiratória, as manobras de Valsalva e Muller afetam a DLCO, por afetar o volume sanguíneo. A manobra de Valsalva reduz a DLCO e a de Muller aumenta⁷. Na técnica clássica a expiração deve ser suave, não forçada e sem hesitação ou interrupção, não podendo exceder 4s. Na RGA, a expiração deve ser contínua até o VR, com um tempo máximo de até 12s, o que torna as medidas de VA nesta técnica mais confiáveis em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

- **Espaço morto e coleta alveolar:** Durante a manobra expiratória o valor do espaço morto anatômico e do equipamento deve ser conhecido. A coleta do gás alveolar antes da eliminação completa do espaço morto (EM) irá reduzir a DLCO, enquanto que a coleta tardia irá aumentar. Na técnica clássica o volume de EM deve ser de 0,75ml a 1L. Quando a CV for < 2 L, ele deve ser reduzido para 0,5L. Na RGA, o sistema identifica o término do espaço morto e o início da amostra de volume alveolar. Essa

é uma das grandes vantagens da técnica RGA, que usando um volume real de espaço morto gera valores mais confiáveis de DLCO, ao contrário da técnica clássica que utiliza um volume de EM fixo pré-determinado.

Em relação ao VA, na técnica clássica, o volume de gás coletado deve ser de 500 a 1000 ml. Por este motivo, o teste só pode ser realizado em pacientes com CV lenta maior que 1,3 L, limitando o seu uso nos pacientes com restrição acentuada. Na técnica RGA faz-se uma medida contínua e coleta-se uma amostra virtual em geral de 200 ml, porém estes analisadores aceitam valores tão baixos como 85 ml de amostra, outra vantagem da RGA. Em ambas as técnicas, é recomendado o uso da metodologia de Jones-Meade para o cálculo do tempo de apneia⁶.

Para melhor entendimento da manobra da DLCO, igual em ambas as técnicas, veja a Figura 1. No gráfico da medida da DLCO com sistema RGA aparece a curva de estabilização do metano, como demonstrado na Figura 2, momento em que se determina o término do EM e o início do VA.

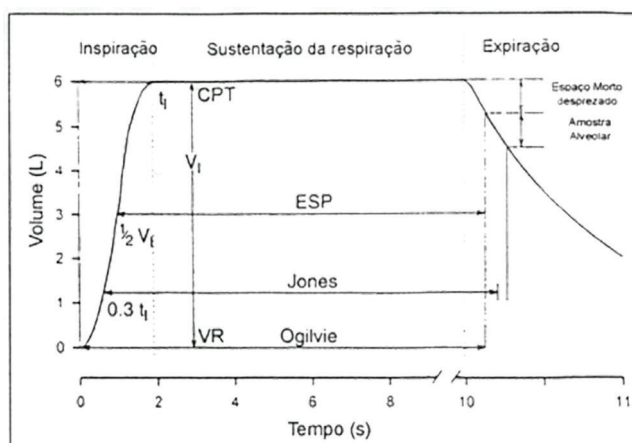


Figura 1. Gráfico da manobra da DLCO.

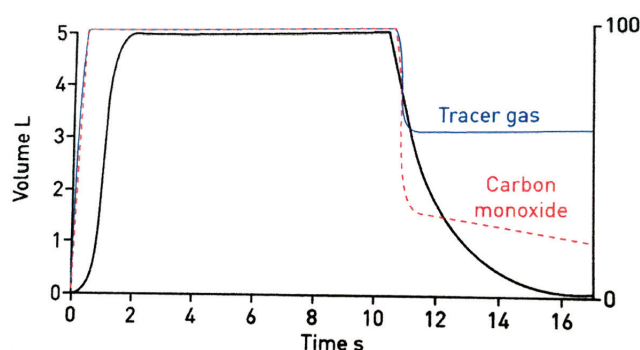


Figura 2. Gráfico da manobra da DLCO na técnica com analisadores rápidos (RGA). Gás traçador: metano. Figura retirada do consenso ATS/ERS³.

Estudos comparando as técnicas usando como gás traçador o hélio (He) ou o metano (CH₄) em normais e em pacientes com DPOC não mostraram diferenças clínicas nas medidas da DLCO⁸.

7. Composição do gás inspirado

A composição do gás para a realização do teste é: 0,3% CO, 21% O₂, gás traçador (hélio: 10% ou metano: 0,3%) e balanço de nitrogênio. O gás traçador deve ser relativamente insolúvel e quimicamente inerte. Nos sistemas tradicionais o gás traçador usado é o hélio, enquanto no sistema com RGA o metano. Salientamos que a disponibilidade do hélio no planeta é finito, dessa forma ele terá que ser substituído como gás traçador a médio e longo prazo.

8. Intervalos entre as manobras

Deve ser obtido no mínimo 4 min de intervalo entre as manobras para se permitir a adequada eliminação do gás do pulmão na técnica clássica. Nos pacientes com obstrução um tempo maior (10 min) deve ser considerada, e inspirações profundas durante este período podem ajudar a eliminar o gás. Na técnica com RGA o sistema informa quando a manobra pode ser repetida, podendo este tempo ser < 4min. Pode se repetir as manobras até 5 tentativas.

Fatores que interferem na medida

- *Condições do paciente:* repouso de 5min antes do exame e posição sentada.

- *Nível de Hb:* considera-se como valor padrão da Hb em homens adultos e adolescentes do sexo masculino de 14.6 g/dL e de 13.4 g/dL em mulheres adultas e crianças (<15 anos). Quando os valores estiverem muito alterados calcular a DLCO ajustada. Stanojevic et al. (2017) sugerem que não seja realizado esse ajuste já que no cálculo dos seus valores teóricos ele não foi realizado, mas sugere que na interpretação do resultado esse dado deve ser levar em consideração⁹.

- *PAO₂:* a oferta de O₂ suplementar deve ser suspenso no mínimo 10 min antes do exame. Nas altitudes elevadas deve ser feito o ajuste pela pressão barométrica (PB). Poluição ambiental também pode interferir na medida da DLCO.

- *Nível de carboxihemoglobina.* O tabagismo, assim como a ingestão de álcool, produz redução da DLCO, devendo ser suspensos no dia do exame.

- A medida pode ser realizada após o broncodilatador nos pacientes com baixa reserva e com dificuldade para realizar a manobra.

Critérios de aceitabilidade

- A relação VI//CV deve ser maior que 90%, porém aceita-se um valor de 85% se o VA desta medida for menor que 200 ml ou 5% (o que for maior) do maior VA das manobras aceitáveis.

- Inalação de 85% do gás no máximo em 4 segundos.

- Tempo de apneia de 10 ± 2s, sem evidências de

vazamentos, manobras de Valsalva ou de Muller

- Coleta de gás alveolar até 4s após o início da expiração. No sistema com RGA, a coleção da amostra virtual será feita após a eliminação completa do espaço morto.

Critérios de reprodutibilidade

No Consenso ATS/ERS de 2005, recomenda-se obter duas manobras aceitáveis com variação menor que 3 ml.min⁻¹ mmHg⁻¹ ou 10%, o que for maior. No Consenso ATS/ERS de 2017, recomenda-se uma variação entre as 2 manobras de 2 mL.min⁻¹.mmHg⁻¹ ou 0,67 mmol.min⁻¹.kPa⁻¹. O valor relatado é a média de 2 manobras aceitáveis e reprodutíveis. Após discussão dos critérios de reprodutibilidade a serem utilizados no nível do Rio de Janeiro, nos equipamentos com analisadores RGA, optamos por usar a diferença de 2 mL.min⁻¹.mmHg⁻¹ (ou 0,67 mmol.min⁻¹.kPa⁻¹) ou 10%, o que for maior.

Controle de qualidade do teste

Conforme a tabela abaixo existe vários níveis de qualidade de exame. O teste que preencher os critérios do escore A, deve ser aceito. Os testes que forem classificados com escores de B a D, podem ser aceitos, porém a interpretação feita com cautela. Os valores encontrados em teste classificado com o escore F não devem ser relatados³ (Quadro 1).

Quadro 1. Controle de qualidade do teste.

Escore	VI/CV	TA	TCA
A	≥ 90%	8-12s	≤ 4 seg
B	≥ 85%	8-12s	≤ 4 seg
C	≥ 80%	8-12s	≤ 5 seg
D	≤ 80%	< 8 ou > 12s	≤ 5 seg
F	≤ 80%	< 8 ou > 12s	> 5 seg

VI/CV: volume inspiratório/capacidade vital; TA: tempo de apneia; TCA: tempo de coleta da amostra

Calibração e controle de qualidade do equipamento

- Os analisadores de fluxo e de gás devem ser zerados antes de cada manobra.

- A calibração de volume com uma seringa de 3L deve ser feita diariamente e deve ser repetida durante o

dia se houver mudança nas condições ambientais (se a temperatura mudar mais de 3° C ou a humidade relativa mais de 15%). Uma nova calibração de volume deve ser feita quando se perceber uma discrepância significativa entre o VI e CV, ou entre VA e CPT.

- Toda semana, ou quando houver suspeita de problemas, deve-se fazer uma DLCO com a seringa de 3 L conectada ao aparelho. Na sequência, a seringa é esvaziada, enche-se até 3 litros, faz-se uma apneia por 10s e a esvazia completamente. O cálculo de VA deve ser de $3\text{ L} \pm 300\text{ ml}$ corrigido de STPD (temperatura e pressão padrões em ar seco) à BTPS (temperatura corporal e pressão ambiente, saturada com vapor d'água), fator de correção: $863 / (PB-47)$. A seringa de 3 L tem um espaço morto adicional, que normalmente é de $\pm 50\text{ml}$, e deve ser considerado no cálculo da VA. O valor absoluto de DLCO deve ser menor que $0,166\text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ ou $0,5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mmHg}^{-1}$. O controle biológico deve ser feito semanalmente, cuja medida não pode variar mais que 12% ou $1\text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ (ou $3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mmHg}^{-1}$) do valor médio prévio.

- Mensalmente um teste de vazamento com seringa de 3 L deve ser feito, assim como o teste da linearidade do analisador do gás. O ideal é que o fabricante do equipamento determine uma função de análise automática de linearidade. Um teste com a seringa de 3L pode ser realizado, em condições ATPS (temperatura ambiente e pressão ambientais, saturada com vapor d'água). Posicione o êmbolo da seringa em $\pm 1\text{ L}$, encher a seringa com o volume remanescente com o gás. Após 10 s esvaziar a seringa. O cálculo do VA deve ser de $3\text{ L} \pm 300\text{ ml}$, usando o valor do espaço morto no cálculo do VA. O valor obtido de DLCO deve ser $< 0,166\text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ ou $< 0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mmHg}^{-1}$.

Todas essas recomendações são as determinadas pelos consensos internacionais já citados, que devem ser consultados para maiores especificações das técnicas e/ou do equipamento^{3,4}.

Confecção do laudo

Os seguintes parâmetros devem constar no laudo do exame:

- DLCO, com colunas para valor teórico (T), LIN e valor em percentual do teórico (%T).
- KCO: valor absoluto, T e %T
- A média da VA, coluna para T e %T.

Se uma medida da CPT tiver sido feita separadamente, ela pode ser relatada em valor absoluto, assim como o valor da relação VA/CPT (opcional). Uma medida de CV é recomendada para avaliar a adequação do VI. Valores do VI, do tempo de apneia, da pressão barométrica (acima do nível do mar) e da Hb, se anormal, também são recomendados.

Teóricos

Existem numerosas equações de referência para o cálculo do valor teórico da capacidade de difusão pulmonar pela técnica de respiração única, mas não está claro qual a equação devemos usar na prática clínica. A seleção de qual equação adotar se mantém um problema. Tem sido observada grandes diferenças entre as diversas equações. A maioria das equações adota altura, sexo e idade para o cálculo dos valores previstos. Mas devemos estar alertas para a possibilidade destes valores de referência serem inadequados para a sua clientela. Pouco se sabe sobre a variação étnica, mas trabalhos já foram publicados reportando valores previstos menores nos pacientes negros.

Em 1981, Crapo publicou um estudo com equações de referência e limites inferiores da normalidade para DLCO e DLCO/VA¹¹. Foram estudadas 245 pessoas residentes em Utah à uma altitude de 1400m. Todas eram não fumantes e sadias. A técnica usada foi a de Ogilvie modificada, aumentando a concentração de O₂ da mistura dos gases para 25%, para estabelecer uma PAO₂ próxima à encontrada no nível do mar. O gás usado para o cálculo do VA foi o hélio. Neste estudo, foram obtidas equações de referência maiores para homens e mulheres em relação a outros estudos.

Um estudo brasileiro foi realizado por Neder em 1999 com o objetivo de estabelecer equações preditivas brasileiras¹². Foram avaliadas 100 pessoas (50 homens e 50 mulheres) de 20 a 80 anos. Estes foram randomicamente selecionados entre mais de 8000 pessoas. A técnica usada foi a de Ogilvie. As equações geradas neste estudo foram significativamente diferentes da maioria dos estudos prévios que usaram predominantemente populações caucasianas. Ao final do estudo, chegou-se à conclusão que se deveria validar estas equações em outras amostras de brasileiros de diferentes etnias e regiões.

Em função da grande diferença entre as equações já publicadas, uma grande compilação internacional foi realizada, com dados a partir de 2000 para se criar um teórico que pudesse ser amplamente utilizado. Este estudo foi retrospectivo e participaram os centros que tinham publicações de equações de referência para a capacidade de difusão pulmonar e que adotaram metodologias semelhantes. Esta compilação incluiu 12.639 indivíduos, de 19 centros em 14 países, na faixa etária de 4 a 91 anos (média de 45 e intervalo interquartil de 26 a 57 anos), sendo 85% da amostra da raça branca. A população não caucasiana era composta de 10% de japoneses e 5% de chineses. Todos os dados foram coletados em equipamentos modernos, sendo que a maior parte utilizou 3 equipamentos (Vmax Encore da SensorMedics, MasterScreen da Jaeger e Collins). Os resultados no Jaeger foram muito semelhantes aos encontrados no SensorMedics. As equações de regressão foram específicas para o

sexo, e na análise multivariada as variáveis idade e altura foram significativas, ao contrário do peso. A comparação com os valores teóricos publicados mais recentemente (alguns incluídos na compilação) foram comparáveis, ao contrário da comparação com teóricos mais antigos. Uma grande vantagem destas equações de regressão é incluir todas as faixas etárias no mesmo teórico⁵.

A implantação do novo teórico sugerido⁵ deve ser avaliada de forma crítica, principalmente no Brasil, para avaliar a necessidade de eventuais adaptações locais.

Conclusão

A técnica com analisadores de gases de resposta rápida (RGA) trouxe muitas vantagens, inclusive porque a manobra para a medida da DLCO, desenvolvido por Krogh em 1914, foi desenhada para indivíduos normais e Graham et al. em 1996, demonstraram que pacientes obstrutivos apresentam fluxos lentos e tempo de apneia curto, realizando a manobra de forma inadequada¹⁰. A técnica tradicional tem limitações nos pacientes com doença pulmonar, e é provável que com a RGA essas dificuldades sejam minimizadas. A RGA também traz outra vantagem importante, permitindo a medida em pacientes com restrição significativa, além de fornecer resultados mais confiáveis pela maior precisão dos analisadores rápidos. Por outro lado, há de se ter uma adequação da técnica utilizada com os teóricos escolhidos. É importante então, que junto com a atualização dos equipamentos, passe-se a utilizar e validar os resultados com os teóricos mais recentes.

Referências

1. Krogh M. The diffusion of gases through the lungs of man. *J Physiol* 1914; 49:271-00.
2. Forster RE, Fowler WS, Bates DV, Van Lingen B. The absorption of carbon monoxide by the lungs during breath-holding. *J Clin Invest.* 1954; 33:1135-45.
3. Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J.* 2017; 49:1600016.
4. MacIntyre N, Crapo RO, Viegi G, Johnson DC, van der Grinten CPM, Brusasco V, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J.* 2005; 26:720-35.
5. Ogilvie CM, Forster RE, Blackmore WS, Morton JW. A standardized breath holding technique for the clinical measurement of diffusing capacity of the lung for carbon monoxide, *J Clin Invest.* 1957; 36:1-17.
6. Jones RE, Meade F. A theoretical and experimental analysis of anomalies in the estimation of pulmonary diffusing capacity by the single breath method. *QJ Exp Physiol.* 1961; 46:131-43.
7. Smith T, Rankin J. Pulmonary diffusing capacity and the capillary bed during Valsalva and Muller maneuvers. *J. Appl Physiol.* 1969; 27:826-33.
8. Salvador-Ong R, Dijkers E, van Steenwijk R, Sterk P. Single-breath diffusion: comparison between helium and methane as tracer gases in COPD and healthy controls. *Eur Respir J.* 2014; 44:S58, 1271.
9. Stanojevic S, Graham BL, Cooper BG, Thompson BR, Carter KW, Francis RW, et al. Official ERS technical standards: Global lung function initiative reference values for the carbon monoxide transfer factor for Caucasians. *Eur Respir J.* 2017; 50:1700010.
10. Graham B, Mink I, Cotton D. Implementing the three-equation method of measuring single breath carbon monoxide diffusing capacity. *Can Respir J.* 1996; 3:247-57.
11. Crapo RO, Morris AH. Standardized single breath normal values for carbon monoxide diffusing capacity. *Am Rev Respir Dis.* 1981; 123:185-89.
12. Neder JA, Andreoni S, Peres C, Nery LE. Reference values for lung function tests III. Carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor). *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:729-37.