Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

تأثیر متفاوت تستوسترون بر درد حاد و مزمن در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده

دکتر اسداله ظریف‌کار[*]
آزاده جامعی[**]
دکتر مهرداد شریعتی[***]

[*] دکترای فیزیولوژی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، بخش فیزیولوژی
[**] کارشناس ارشد فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، بخش فیزیولوژی
[***] دکترای زیست‌شناسی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، بخش فیزیولوژی

تاریخ وصول: ۱۳۸۶/۷/۱۷
تاریخ پذیرش:۱۳۸۶/۱۲/۸

مؤلف مسئول : دکتر اسداله ظریف‌کار
پست الکترونیک: zarifkara@sums.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: شدت حس درد و پاسخ رفتاری به درد در دو جنس نر و ماده متفاوت است. این اختلاف اشاره به این دارد که هورمون‌های جنسی ممکن است بر سیستم حس درد اثر داشته باشند. لذا هدف از این تحقیق تعیین تأثیر متفاوت تستوسترون بر درد حاد و مزمن در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده بود.

مواد و روش‌ها: این تحقیق تجربی در سال ۱۳۸۵ و در بخش فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون انجام گردید. در این پژوهش تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۰ ± ۱۹۰ گرم به چهار گروه هشت‌تایی تقسیم‌بندی شدند؛ گروه کنترل که هیچ دارویی دریافت نکردند، گروه شاهد که در آنها جراحی انجام می‌شد، ولی بیضه‌ها خارج نمی‌گردید، گروه گنادکتومی که ۰/۵ میلی‌لیتر حلال (روغن زیتون) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و گروه گنادکتومی که تستوسترون انانتات (۶ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) در ۰/۵ میلی‌لیتر حلال به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. روز ششم بعد از گنادکتومی تست فرمالین روی همه نمونه‌ها انجام شد. داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که درد مرحله حاد تست فرمالین در موش‌های گنادکتومی شده که تستوسترون دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۰۱$)، اما درد مزمن در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۰۱$) .

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد که تستوسترون موجب افزایش حساسیت گیرنده‌های درد و در نتیجه افزایش درد حاد می‌شود. از طرف دیگر تستوسترون از طریق مرکزی و احتمالاً با تداخل عمل با سیستم‌های تعدیل درد باعث کاهش درد مزمن در آزمون فرمالین می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: تستوسترون، درد حاد، درد مزمن، آزمون فرمالین، موش گنادکتومی شده

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

مقدمه

شدت حس درد در زنان و مردان متفاوت می‌باشد. آزمایش‌های مختلفی برای پی بردن به علت اختلافات موجود در حس درد و پاسخ رفتاری به درد در دو جنس نر و ماده انجام گرفته است(۲ و ۱).

طی این آزمایش‌ها نتایج قطعی دال بر اثرات هورمون‌های استروئیدی گنادی که عامل اصلی تفاوت‌های جنس نر و ماده است بر حس درد به دست نیامده است. تحقیقاتی چند در رابطه با اثر هورمون‌های استرادیول و تستوسترون بر میزان درد صورت گرفته و نتایج متناقضی ارایه گردیده است(۴و۳).

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که هورمون‌های استروئیدی گنادی باعث تعدیل حساسیت به درد می‌شوند(۲). همچنین تحقیقات انجام شده بیانگر آن است که اختلافات جنسی، موجب تعدیل پاسخ ضد دردی و ضد هایپرآلژزی اپیوئیدها در موش صحرایی می‌گردد(۵).

در مطالعه دیگر مشخص شد که با دستکاری استروئیدهای گنادی در موش‌های ماده حس درد تعدیل می‌گردد، اما در موش نر تغییری ایجاد نمی‌گردد، در حالی که در هر دو جنس اثر ضد دردی مرفین تعدیل می‌شود(۶).

در تحقیق بعدی به وسیله همین گروه در سال ۲۰۰۵ مشخص شد که هورمون‌های تولید مثلی تستوسترون در جنس نر و استرادیول در جنس ماده موجب تعدیل حساسیت به اثر بی‌دردی اپیوئیدها در حیوانات بالغ نمی‌گردد(۷).

از آنجا که مهمترین هورمون استروئیدی در جنس نر تستوسترون می‌باشد، هدف از این تحقیق تعیین تأثیر متفاوت تستوسترون بر درد حاد و مزمن در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق تجربی تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۰ ± ۱۹۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون در سال ۱۳۸۵ تهیه و به طور تصادفی در چهار گروه هشت‌تایی تقسیم‌بندی شدند.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق این دانشگاه به تصویب رسید.

حیوانات در قفس‌های استاندارد و در شرایط آزمایشگاهی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به غذا و آب کافی نگهداری و به چهار گروه به صورت زیر تقسیم‌بندی شدند؛ گروه ۱، گروه کنترل که عمل جراحی روی آنها انجام نشد و هیچ دارویی دریافت نکردند، گروه ۲، گروه شاهد(شم) که در آنها عمل جراحی انجام می‌شد، ولی بیضه‌ها خارج نمی‌گردید و دارو دریافت نکردند، گروه۳، گروه گنادکتومی که یک روز بعد از عمل جراحی ۰/۵

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

میلی‌لیتر حلال (روغن زیتون) به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند و گروه ۴، گروه گنادکتومی که یک روز بعد از عمل جراحی، تستوسترون انانتات (۶ میلی‌گرم به ازای ۱۰۰گرم وزن بدن) در ۰/۵ میلی‌لیتر حلال به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند. تزریق این دوز تستوسترون انانتات (به دلیل طولانی اثر بودنش نسبت به سایر ترکیبات آندروژنی) تا بیش از ۷ روز همچنان موجب بالا ماندن غلظت تستوسترون پلاسما می‌شود(۸).

برای عمل کنادکتومی، ابتدا حیوان با کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و با تزریق درون ماهیچه‌ای) همراه بیهوشی سبک به وسیله اتر بیهوش می‌شد. سپس حیوان بیهوش شده به پشت بر روی تشک جراحی گذاشته می‌شد و دست‌ها و پاهای حیوان ثابت می‌گردید. پوست اسکروتوم، به طور کامل تراشیده شده و بیضه‌ها، با یک شکاف طولی در راستای خط میانی دو بیضه، از اسکروتوم بیرون آورده و سپس محل جراحی با سرم فیزیولوژی شسته و بخیه می‌شد. عمل جراحی بر روی گروه شاهد (شم) به همین ترتیب انجام پذیرفت، اما بیضه‌ها بیرون آورده نشد. روز ششم بعد از عمل گنادکتومی، تست فرمالین روی تمامی گروهها انجام شد.

ثبت پاسخ‌های رفتاری حیوان به صورت دو سو کور انجام گرفت. حدود ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش تست فرمالین، حیوانات به محل آزمایش آورده می‌شدند تا با محیط مطابقت حاصل نمایند.

فرمالین ۲/۵ درصد به کف پای راست حیوان تزریق می‌شد و بلافاصله در محفظه آزمایش، از جنس پلکسی گلاس با ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ قرار داده می‌شد. پاسخ رفتاری درد به کمک آینه‌ای که با زاویه ٤٥ درجه نسبت به سطح افق در زیر محفظه تعبیه شده بود مشاهده می‌گردید و هر ۱۵ ثانیه، پاسخ حرکتی درد به صورت اعداد صفر، ۱، ۲ و۳ مطابق روش دوبوسون و دنیس[1] ثبت و نمره درد[2] محاسبه می‌گردید(۹). هر حیوان فقط یک بار مورد تست فرمالین قرار می‌گرفت و بعد از آزمایش از بین می‌رفت. در انتها نمره درد در طی ۶۰ دقیقه زمان آزمون به صورت ۱۲ بلوک ۵ دقیقه‌ای محاسبه گردید و میانگین نمره درد در هر بلوک ۵ دقیقه‌ای طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$Pain-Score=\frac{0T_0+1T_1+2T_2+3T_3}{20}$$

در این فرمول T_0،T_1،T_2 و T_3 تعداد ۱۵ ثانیه‌هایی است که حیوان در یک دوره ۵ دقیقه‌ای به ترتیب رفتارهای صفر،۱ ،۲ و۳ را نشان می‌داد. دقایق ۵ ـ۰ و ۶۰ ـ۱۶ به ترتیب به عنوان مراحل حاد و مزمن درد در نظر گرفته شدند(۱۲ ـ ۱۰) .

داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله نرم‌افزار SPSS[3] و آزمون آنالیز واریانس [4] تحلیل گردید.

1-Dubuisson & Dennis
2-Pain Score
3-Statistical Package for Social Sciences
4-One-Way Analysis of Variance

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

یافته‌ها

مقایسه میزان درد در طول زمان ۶۰ دقیقه‌ای آزمون فرمالین در هر چهار گروه، در نمودار ۱ نشان داده شده است. میزان درد حاد (در ۵ دقیقه اول) در گروه شاهد (شم) به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کمتر است($p<۰/۰۱$)، اما درد مزمن در گروه کنترل و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

بررسی آماری نشان می‌دهد که میزان درد حاد در گروهی که گنادکتومی شده‌اند نسبت به سه گروه دیگر کمتر است($p<۰/۰۰۱$). میانگین نمره درد حاد در گروهی که بعد از گنادکتومی تستوسترون دریافت کرده‌اند با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد(نمودار ۲).

مقایسه میزان درد مزمن در هر چهار گروه در نمودار۳ نشان داده شده است. میانگین نمره درد در گروه گنادکتومی که تستوسترون دریافت نمودند، نسبت به سایر گروهها نشان از اختلاف معنی‌دار با $p<۰/۰۰۱$ دارد.

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجا که شدت درد در دو جنس نر و ماده متفاوت می‌باشد(۱)، هدف از این تحقیق تعیین تأثیر متفاوت تستوسترون بر درد حاد و مزمن در موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده است.

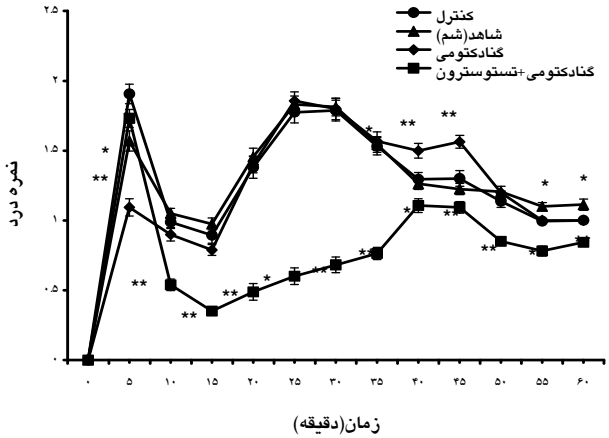
در تحقیق حاضر برای بررسی اثرات تستوسترون بر میزان حس درد از تست فرمالین استفاده شد، زیرا در میان مدل‌های مختلف درد مزمن، تست فرمالین به عنوان یک مدل معتبر تحقیقاتی شناخته شده است که حساسیت مرکزی به وجود آمده در سطح نخاعی را بعد از التهاب محیطی مشخص می‌سازد و نیز گزارش‌های متعددی دال بر دخالت سیستم‌های نروترانسمیتری نظیر ماده ــ پی، گلوتامات، سروتونین و هیستامین در پاسخ فرمالینی ارایه شده است(۱۵ـ۱۳).

به طورکلی در این تحقیق، مقایسه میزان درد حاد طی آزمون فرمالین در گروه گنادکتومی دریافت کننده تستوسترون با گروه شاهد حاکی از این مطلب می‌باشد که تزریق تستوسترون انانتات باعث افزایش درد حاد در این گروه شده است. از طرف دیگر مقایسه میزان درد مزمن طی آزمون فرمالین در گروه گنادکتومی دریافت کننده تستوسترون انانتات با گروه شاهد نشان از کاهش درد مزمن در این گروه دارد. این نتایج در مورد اثر ضد دردی تستوسترون تأیید کننده نتایج تحقیقات انجام شده به وسیله کرافت و همکاران[۱](۲۰۰۴)،آلوئیسی و همکاران [۲](۲۰۰۴) و سسارلی و همکاران [۳](۲۰۰۳) می‌باشد(۱۶ و۲،۳) . در حالی که نتایج حاصل از تحقیقات خاسار و همکاران[۴](۲۰۰۳) و هائو و همکاران[۵](۲۰۰۴) را پشتیبانی نمی‌کند(۱۸و۱۷).

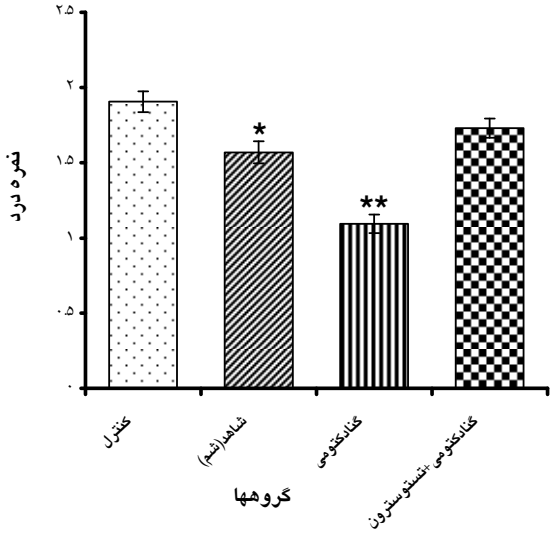
تحقیقات قبلی نشان داده است که در موش‌های صحرایی، اختگی موجب کاهش چشمگیری

1-Craft et al
2-Aloisi et al
3-Ceccarelli et al
4-Khasar et al
5-Hau et al

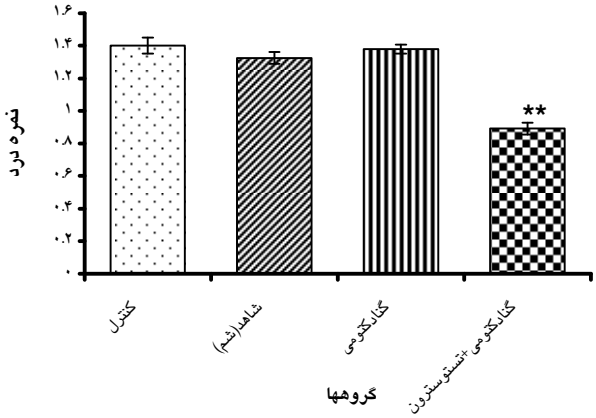
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020



نمودار ۱: مقایسه میانگین نمره درد در گروههای مختلف در طول دوره تست فرمالین
(علامت * و ** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱)



نمودار ۲: مقایسه نمره درد حاد در گروههای مختلف (علامت* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل p <۰/۰۱ و
علامت اختلاف معنی‌دار با سایر گروهها p< ۰/۰۰۱)**



نمودار۳ : مقایسه نمره درد مزمن در گروههای مختلف
(علامت اختلاف معنی دار با سایر گروهها p<۰/۰۰۱)**

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

در آستانه درد حاد در آزمون عقب کشیدن دم با تحریک الکتریکی می‌شود و با تزریق تستوسترون آستانه به حد نرمال بر می‌گردد (۱۹) که با نتایج حاضر مغایرت دارد. با انجام بررسی‌های دیگر به وسیله نایبی و احمدیانی(۱۹۹۹) گزارش گردید که اختگی باعث کاهش درد مزمن در موش صحرایی می‌گردد، اما روی درد حاد اثری ندارد. نتایج مطالعه آنها نشان داد که سیستم سروتونرژیک در بی دردی ایجاد شده به وسیله تستوسترون نقش مهمی دارد، چون تزریق همزمان فلوکستین به عنوان یک افزایش دهنده سروتونین با فلوتامید به عنوان آنتاگونیست تستوسترون، موجب تقویت اثر بی‌دردی می‌شود. بنابراین، بی دردی ایجاد شده در اثر اختگی ممکن است از طریق تداخل عمل با سیستم سروتونرژیک نخاع باشد(۲۰). از طرف دیگر نشان داده شده است که استروئیدهای جنسی از طریق مکانیسم‌های اپیوئیدی باعث کاهش درد می‌شود، زیرا با به کارگیری آنتاگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی (نالوکسان) اثر ضددردی استروئیدهای جنسی بر می‌گردد(۴).

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر و با جمع‌بندی تحقیقات انجام شده، به نظر می‌رسد که مکانسیم کاهش درد مزمن به وسیله تستوسترون با توجه به این که از سد خونی ـ مغزی می‌گذرد، از طریق تداخل عمل با سیستم‌های مرکزی تعدیل درد به ویژه سیستم سروتونرژیک(۲۱) و سیستم اپیوئیدی (۳) باشد، اما در مورد درد حاد احتمالاً تستوسترون به صورت محیطی و با حساس نمودن گیرنده‌های درد موجب پایین آمدن آستانه تحریک آنها شده است. پیشنهاد می‌گردد تحقیقات گسترده‌تری در مورد چگونگی و میزان فعالیت سیستم‌های تعدیل درد آدرنرژیکی، سروتونرژیکی و اپیوئیدی مغز و نخاع در حیوانات گنادکتومی شده، انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی بخش فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون که در انجام این مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر می‌گردد

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

Different Effects of Testosterone on Acute and Chronic Pain in Gonadectomized Male Rats

Zarifkar A[*] ,
Jamei A[**],
Shariati M[***].

[*]Associate Professor of Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[**]MSc in Physiology, Department of Physiology, Islamic Azad University of Kazeroon, Kazeroon, Iran
[***]Assistant Professor of Animal Biology, Department of Physiology, Islamic Azad University of Kazeroon, Kazeroon, Iran

KEYWORDS:
Testosterone,
Acute Pain,
Chronic Pain,
Formalin Test,
Gonadectomized Rats

Received: 17/7/1386
Accepted: 8/12/1386

Corresponding Author: Zarifkar A
E-mail: zarifkara@sums.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Nociception and behavioral responses to noxious stimuli are different in males and females. It seems that these differences are due to the effects of sex hormones on the pain mechanisms. The aim of the current study was to evaluate the effect of testosterone administration on nociception by formalin test in gonadectomized rats.

Material & Methods: In this study 32 male wistar rats were divided into four groups (n=8); the control rats without receiving any drug or surgical operation, the sham – operated animals with surgical stress, the gonadectomized rats receiving 0.5 ml vehicle (olive oil) i.p., and the gonadectomized rats receiving testosterone enantate (6 mg/100 gr body weight in 0.5 ml vehicle i.p.). On the sixth day after gonadectomy operation, formalin test was done in all rats. Pain scores in formalin test were statistically analyzed by SPSS and ANOVA.

Results: The results showed that testosterone caused an increase in pain score in acute phase of formalin test in gonadectomized rats compared with sham-operated group ($p<0.001$). However, pain score in chronic phase was significantly reduced in testosterone received rats ($p<0.001$).

Conclusion: It can be concluded that testosterone increases nociception in acute phase of formalin test in gonadectomized rats. On the other hand, testosterone relieved pain during chronic phase. Anti-nociceptive effects of testosterone in chronic phase may be through central nervous system by interacting with endogenous pain modulatory systems.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 16:59 +0430 on Tuesday March 31st 2020

REFERENCES:

1.Aloisi AM, Bonifazi M. Sex hormones, central nervous system and pain. Horm Behav 2006; 50(1):1-7.
2.Craft RM, Magil JS, Aloisi AM. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. Eur J Pain 2004 ; 8(5): 397-411.
3.Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, De Padova AM, Massafra C. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. Neurosci Lett 2004; 361(1-3): 262-4.
4.Aloisi AM, Ceccarelli I. Role of gonadal hormones in formalin-induced pain responses of male rats: modulation by estradiol and naloxone administration. Neuroscience 2000; 95(2): 559-66.
5.Cook CD, Nickerson MD. Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats. J Pharmacol Exp Ther 2005; 313(1): 449-59.
6.Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM. Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. Pain 2003; 103(3): 285-302.
7.Stoffel EC, Ulibarri CM, Folk JE, Rice KC, Craft RM. Gonadal hormone modulation of mu, kappa, and delta opioid antinociception in male and female rats. J Pain 2005; 6(4): 261-74.
۸. ظریف‌کار اسداله، آی جعفر، جزایری زهرا. اثر میزان بالای تستوسترون انانتات بر کارکرد غده تیروئید در موش صحرایی. مجله تحقیقات پزشکی شیراز۱۳۸۲؛ دوره ۲، شماره ۲: ۱۰-۱ .
9.Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rat and cats. Pain 1977; 4: 161-74.
۱۰.ظریف‌کار اسداله، اسکندریان حسین، مختاری مختار، آی جعفر. ارزیابی اثرات ضد درد اوژنول با استفاده از تست فرمالین. مجله دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران۱۳۸۲؛ دوره ۱۶، شماره ۱: ۶۷-۶۱.
۱۱.ظریف‌کار اسداله، کرمی خیرآباد مریم، اجتهادی مجید، رستگار کریم، قلجه مهناز. ارزیابی اثر ضددردی گالبانوم (الئوگم رزین گیاه باریجه) به وسیله تست فرمالین در موش. ارمغان دانش، فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج ۱۳۸۶؛ دوره ۱۲، شماره ۱: ۲۶-۱۹.
12.Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: An evaluation of the method. Pain1992; 51: 5-17.
13.Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. Brain Res 1990; 535:155-8.
14.Hunter JC, Singh L. Role of excitatory amino acid receptors in mediation of the nociceptive response to formalin in the rat. Neurosci 1994; 174: 217-21.
15.Willis WD. Role of neurotransmitters in sensitization of pain responses. Ann N Y Acad Sci 2001; 933:142-56.
16.Ceccarelli I, Scaramuzzino A, Massafra C, Aloisi AM. The behavioral and neuronal effects induced by repetitive nociceptive stimulation are affected by gonadal hormones in male rats. Pain 2003; 104(1-2): 35-47.
17.Khasar SG, Green PG, Gear RW, Isenberg W, Levine JD. Gonadal hormones do not account for sexual dimorphism in vagal modulation of nociception in the rat. J Pain 2003; 4(4): 190-6.
18.Hau M, Dominguez OA, Evrard HC. Testosterone reduces responsiveness to nociceptive stimuli in a wild bird. Horm Behav 2004; 46(2):165-70.
19.Pednekar JR, Mulgaonker VK. Role of testosterone on pain threshold in rats. Indian J Physiol Pharmacol 1995; 39(4): 423-4.
20.Nayebi AR, Ahmadiani A. Involvement of the spinal serotonergic system in analgesia produced by castration. Pharmacol Biochem Behav 1999; 64(3): 467-71.
21.Nayebi AR, Rezazadeh H. Involvement of serotoninergic mechanism in analgesia by castration and flutamide, a testosterone antagonist, in the rat formalin test. Pharmacol Biochem Behav 2004; 77(1): 9-14.