

UN ESTUDIO PILOTO ACERCA DEL IMPACTO DE LAS EMOCIONES HUMANAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA EXPRESIÓN PROTEICA A TRAVÉS DE ONDAS ACÚSTICAS

David del Rosario-Gilabert^{1,2,3}

Gema Esquiva^{2*}

Violeta Gomez-Vicente²

Daniel Ruiz³

Pedro Poveda¹

Jesús Carbajo¹

Jaime Ramis¹

¹ Departamento de Física, Ingeniería de Sistemas y Teoría de la Señal (Universidad de Alicante)

² Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía (Universidad de Alicante)

³ Departamento de Informática (Universidad de Alicante)

RESUMEN

La comunicación emocional es un fenómeno multimodal que afecta a la postura, los gestos, las expresiones faciales y la voz humana. En este contexto, los estados afectivos modulan sistemáticamente las señales acústicas emitidas en la producción del habla mediante los músculos laríngeos vía sistema nervioso central, transformando la señal acústica en un medio de transmisión afectivo. Diversos trabajos han analizado los parámetros acústico-emocionales de la voz humana, concluyendo que la calidad de voz, la frecuencia fundamental o el tono juegan un papel primordial en la expresión emocional. Paralelamente, un creciente número de estudios acumulan evidencia de la capacidad de las ondas mecánicas para afectar a la proliferación celular, poniendo de relieve el papel de las ondas mecánicas como agente biofísico. La presente investigación se centra en analizar los efectos de señales acústico-emocionales sobre la proliferación celular de la línea 661W y la expresión proteica. Para tal fin, se ha diseñado y calibrado un sistema de radiación electroacústico en el interior de una incubadora de CO₂ y establecido un método de captación de la señal acústico-emocional. Resultados preliminares apuntan a la capacidad de señales acústico-emocionales para influir sobre la proliferación celular.

ABSTRACT

Emotional communication is a multimodal phenomenon involving posture, gestures, facial expressions and the human voice. In this context, affective states systematically modulate the acoustic signals emitted in speech production through the laryngeal muscles via the central nervous system, transforming the acoustic signal into a means of affective transmission. Several studies have analyzed the acoustic-emotional parameters of the human voice, concluding that voice quality, fundamental frequency or pitch play a major role in emotional expression. In parallel, a growing number of studies accumulate evidence of the ability of mechanical waves to affect cell proliferation, highlighting the role of mechanical waves as a biophysical agent. The present investigation focuses on analyzing the effects of acoustic-emotional signals on 661W cell proliferation and protein expression. For this purpose, an electroacoustic radiation system has been designed and calibrated inside a CO₂ incubator and a method of acoustic-emotional signal capture has been established. Preliminary results point to the ability of acoustic-emotional signals to influence cell proliferation.

Palabras Clave — voz humana, emociones, agradecimiento, proliferación celular, expresión proteica.

* Autor de contacto: gema.esquiva@ua.es

Copyright: ©2023 del Rosario-Gilabert, D. et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el principio de los tiempos, las emociones han atraído la atención de la comunidad científica debido a su impacto sobre el día a día de los seres humanos y su bienestar [1]. Después de todo, las emociones forman parte inherente de la experiencia humana y juegan un papel fundamental en la comunicación con los demás [2], afectando a la postura, los gestos, las expresiones faciales y sonoras [3]–[8]. Sin embargo, comparado con las expresiones faciales, la expresión sonora de la emoción ha permanecido en segundo plano, a pesar de que diversos estudios atribuyen a la voz un papel destacado en el reconocimiento de la experiencia emocional [9], [10].

La expresión sonora de las emociones es un fenómeno complejo. Las personas alzan la voz cuando están felices o enfadadas, modificando mediante los músculos laríngeos las características de la voz [11], [12] y codificando información emocional en la señal acústica resultante [13]–[15]. A fin de cuentas, las emociones modifican las características del aparato fonador [13]–[15] influyendo sobre diferentes parámetros acústicos como la frecuencia fundamental, la intensidad o el tono [16]–[19].

El impacto de nuestro estado emocional o de salud sobre la voz humana es tal, que las personas son capaces de percibir y diferenciar emociones ajenas atendiendo únicamente a las señales de voz [20]–[24]. En este sentido, se han desarrollado sistemas de diagnóstico basados en biomarcadores acústicos capaces de detectar patologías como la depresión, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica u otras enfermedades neurológicas [25]–[31].

Paralelamente, diversos estudios en el ámbito de la biología han constatado la capacidad de las ondas mecánicas para inducir cambios en el comportamiento celular [32]–[39]. En concreto, la energía mecánica podría influir sobre la proliferación [40], la migración [40]–[42], diferenciación [43] o expresión génica [44] de diferentes líneas celulares. Entre los estímulos acústicos más estudiados en la literatura se encuentra el ruido, la música clásica o tonos puros [45]. Sin embargo, hasta la fecha, no se tiene constancia de trabajos que estudien los efectos de señales acústico-emocionales sobre el comportamiento celular. El objetivo del presente trabajo es determinar si las señales acústico-emocionales tienen la capacidad de influir sobre la proliferación de la línea celular 661W.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Inducción y captación de la señal acústico-emocional

El agradecimiento, entendido como la capacidad de un sujeto para sentir gratitud al reconocer y valorar lo que otra persona ha hecho por ella [46], [47], fue la emoción elegida para la experimentación. Entre los motivos principales se hallan, por un lado, la existencia de protocolos fiables para inducir un

estado de agradecimiento en el laboratorio basados en escritura [48], [49], y, por otro, la posibilidad de cuantificar emoción inducida mediante un análisis de texto afectivo.

El participante escribió un texto de agradecimiento basado en el trabajo de Toepfer and Walker [49] y leyó el texto a una distancia de 15 centímetros de un micrófono de condensador (Rode NT5 S) acoplado a un dispositivo acústico (Kaotica Eyeball) para ruidos y efectos de sala. El transductor se conectó a una grabadora Zoom-H6 y fue registrado en formato WAV (16 bits, 44.100 Hz). Redacción y locución se realizaron en un ambiente tranquilo y privado.

2.2. Sistema de radiación electroacústico

La señales acústicas fueron radiadas sobre las placas de cultivo mediante un altavoz Bose SoundLink Color II suspendido en una percha acústica en una incubadora de CO₂, a un nivel de presión sonora (L_p) equivalente de 80 dB (calibrado realizado con sonómetro NA-28, número de serie 00762289, Rion Co. Ltd., Tokio, Japón) durante 72 horas. El transductor se conectó a un reproductor WAV (AGPTEK 32GB) con un cable mini Jack de 3.5 mm debidamente apantallado y a un HUB que le suministra energía.

Con objeto de minimizar el ruido de fondo de la incubadora, proveniente de sistemas electromecánicos y actuadores que mantienen las condiciones celulares óptimas [50], se realizó un tratamiento vibroacústico basado en elementos pasivos. Sobre sus paredes se dispuso material fonoabsorbente EliAcoustic Piramidal (595,0 x 595,0 mm con un espesor de 50 mm y una densidad de 29 kg/m³). En la bandeja de la incubadora se instaló aislante COPOPREN (470 x 490 mm de 80 mm de espesor y 80 kg/m³ de densidad).

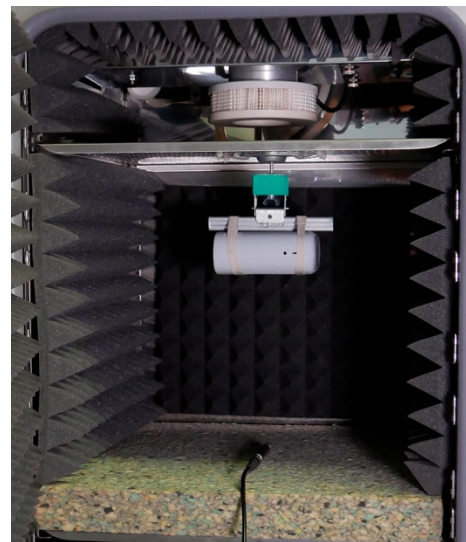


Figura 1. Set-up empleado. Sobre una incubadora convencional se dispone un tratamiento acústico compuesto por paneles fonoabsorbentes y un panel aislante para la reducción de vibraciones en las placas de cultivo celular.

2.3. Medidas de nivel de ruido

El setup general empleado en las medidas experimentales está compuesto de los siguientes elementos: Software ARTA (versión 1.9.1), tarjeta de adquisición TASCAM 144 mk2 y altavoz Bose SoundLink Color II suspendido en una percha acústica. En el caso de las medidas L_p se empleó un transductor micrófono Brüel&Kjaer (4188-A-21) así como un acondicionador de señal CCLD Brüel&Kjaer de 2 canales (1704-A-002). Se realizaron 9 medias sobre la bandeja de la incubadora (matriz de 3x3) en funcionamiento sin y con la solución de control de ruido propuesta.

2.4. Diseño experimental

En cuando a la metodología experimental, se seleccionaron 4 condiciones: (i) control (ii) voz emocional (iii) voz no emocional (iv) voz emocional sintetizada. En la condición “control”, el sistema electroacústico permaneció apagado y las células se incubaron durante 72 horas. La condición “voz emocional” corresponde a la versión acústica del estímulo emocional descrito en la sección 2.1. La condición “voz no emocional” consistió en el registro de un fragmento de texto de “Don Quijote de la Mancha”, en condiciones idénticas al caso (ii) y por el mismo sujeto. El estímulo “voz emocional sintetizada” se generó a partir de VoiceOver, una tecnología de lectura basada en síntesis de voz integrada en el sistema operativo Mac OS X. La señal de acústica se sintetizó a partir del texto de agradecimiento redactado por el participante (sección 2.1), y contuvo las mismas palabras, cadencia y amplitud sonora que la condición (ii). En última instancia, la señal de voz emocional sintetizada (iv) se ajustó atendiendo al registro de onda del secuenciador (Steinberg Cubase SX) para asegurar la máxima sincronía y equilibrar amplitudes.

Todos los estímulos fueron normalizados (-3 dB), limitados digitalmente (-1 dB) y radiados sobre las células durante 72 horas a un L_p equivalente de 80 dB (1 min). Además, se calculó y analizó tanto el espectro en frecuencia como el espectrograma de cada estímulo (Matlab R2020a).

2.5. Ensayos biológicos

Para los ensayos biológicos se empleó la línea celular 661W (Dr. Muayyad Al-Ubaidi, Universidad de Oklahoma). Se trata de una línea celular no auditiva derivada de retina de ratón transgénico que expresa marcadores de fotorreceptores y células ganglionares de la retina [51], [52].

2.5.1 Ensayo de proliferación celular

Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, 4,5 g/l de glucosa) suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina y suero bovino fetal inactivado al 10 % (v/v) (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Alemania). Se sembraron de forma rutinaria

a una densidad de 100.000 células/flask y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Para los ensayos de proliferación, se sembró a una densidad de 3k células/pocillo (6 réplicas) y se incubó durante 24 h. A continuación, las placas se transfirieron a la incubadora de prueba (FormaTM Steri-CycleTM CO2 incubator model 371, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EE. UU.) y se mantuvieron 72 h para cada una de las condiciones descritas.

La proliferación celular se evaluó siguiendo el protocolo de Mickuviene et al., 2004 [53]. Tras exponer las células a las condiciones experimentales (subsección 2.4), se fijaron con etanol al 96 % (v/v) durante 10 min, seguido de tinción con cristal violeta al 0,05 % (p/v) disuelta en etanol al 20 % (v/v) durante 30 min. Se realizaron 3 lavados sucesivos con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y las placas se secaron a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se añadieron a cada pocillo 100 µL de etanol al 50% (v/v) y solución de ácido acético al 0,1% (v/v) para disolver el colorante, y la placa se incubó durante 5 min (temperatura ambiente). Finalmente, el sobrenadante se transfirió a una placa limpia de 96 pocillos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (AD 340 Microplate Reader, Beckman Coulter, Brea, CA, EE. UU.) a 620 nm. La absorbancia obtenida se correlacionó con la densidad celular.

2.5.2 Ensayo de inmunocitoquímica

Las células de la línea 661W se sembraron en placas de poliestireno estériles de 24 pocillos (#3524, Costar, Corning Optical Communications, Madrid, España) a diferentes densidades (10k, 15k y 20k células/pocillo). Por cada densidad se realizaron 8 réplicas. A continuación, se incubaron con el sistema electroacústico apagado (grupo “control”) y en presencia de los diferentes estímulos bajo estudio a 80 dB durante 72 h.

Tras el experimento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (p/v) (#P6148 Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemania) en PBS durante 10 min. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS y se permeabilizó con Tritón X-100 al 0,1% (v/v) (#T8787 Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 min, seguido de otros 3 lavados de 5 min. Después, se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA; #A2153, Sigma-Aldrich) al 1% (p/v) en PBS durante 1 h. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario que reconoce la proteína Ki67 (1:100, #28074-1-AP, Proteintech, un conocido biomarcador relacionado con la proliferación celular [54]. La incubación tuvo lugar durante toda la noche a 4°C en una cámara humidificada.

2.6. Estadística

Se utilizó el análisis estadístico para evaluar tanto los resultados de proliferación como de expresión proteica. En ambos casos, se realizó la prueba de Grubbs (detección de valores atípicos) y se calcularon estadísticos básicos. La normalidad de la muestra se verificó mediante Kolmogorov-

Smirnov. Las varianzas (absorbancia en el caso de la proliferación celular y brillo/píxel en inmunocitoquímica) se compararon mediante la prueba t de dos muestras.

3. RESULTADOS

En primer lugar, se realizaron las mediciones experimentales de la solución de control de ruido propuesta, obteniendo los siguientes resultados:

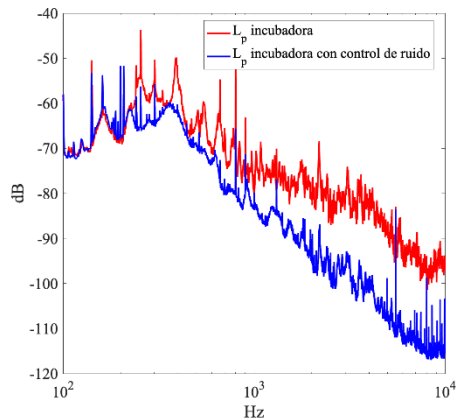


Figura 2. Mediciones de ruido aéreo. La medición muestra los efectos de la solución propuesta sobre el ruido de fondo. Línea roja: L_p medio normalizado de la incubadora de CO_2 en condiciones habituales de funcionamiento. Línea azul: L_p medio normalizado de la solución de control de ruido compuesta por un tratamiento a ruido aéreo y un sistema de aislamiento sobre la bandeja de cultivo.

A continuación, se exponen los resultados relativos a los ensayos biológicos descritos anteriormente (sección 2.5).

Tabla 1. Resumen estadístico en las distintas condiciones bajo estudio frente a la condición de *control*. La tabla muestra tanto los ensayos de proliferación celular (absorbancia) como el análisis de las imágenes de microscopía confocal tras ensayo de inmunocitoquímica (proteína Ki67).

Ensayo biológico	Condición	Estadístico
Proliferación celular	<i>voz emocional</i>	$**p<0,01$
	<i>voz no emocional</i>	$p=0,22$
	<i>voz emocional sintetizada</i>	$p=0,44$
Inmunocitoquímica [brillo/píxel]	<i>voz emocional</i>	$*p<0,05$

Los resultados evidencian una mayor proliferación así como una elevada expresión de Ki67 en la condición de voz emocional (agradecimiento) respecto a la condición de control. En el caso del ensayo de proliferación celular ($n=3$, 6 réplicas por placa), el valor medio es de absorbancia es de $0,7106 \pm 0,0331$ para la condición de control y $0,7976 \pm 0,0539$ para la condición de voz emocional ($**p<0,01$). En cuanto a la prueba inmunocitoquímica se refiere ($n=9$ regiones de interés aleatorias), el valor medio de brillo por píxel es de

$0,309 \pm 0,017$ para la condición de control y $0,466 \pm 0,015$ para la condición de voz emocional.

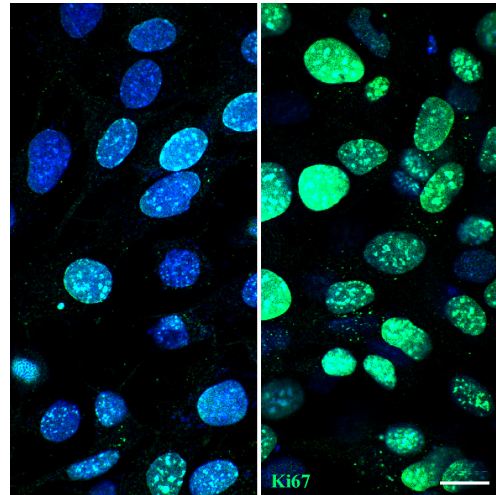


Figura 3. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal para la proteína Ki67. La fotografía de la izquierda hace referencia a la condición de *control*, mientras la fotografía de la derecha corresponde a la condición *voz emocional* (agradecimiento). La elevada presencia de fluorescencia en la condición *voz emocional* (color verde) indica una mayor expresión de Ki67.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las emociones son un fenómeno multimodal que afecta a la voz humana [11], [12]. La experiencia emocional modifica las características del aparato fonador [13]–[15] influyendo sobre los parámetros físicos y acústicos de la voz humana [16]–[19]. En la literatura, existe una amplia evidencia de que la energía sonora es capaz de inducir cambios significativos a nivel celular y genético [37], [44], [45]. El presente trabajo estudia si los cambios físico-acústicos ocasionados por una emoción de agradecimiento sobre la voz humana puede influir en la proliferación celular y la expresión de Ki67 de la línea celular 661W (no auditiva).

A la vista de los resultados, los cambios físico-acústicos originados por respuestas emocionales de agradecimiento codificadas en la voz humana, podrían influir de manera significativa en la proliferación celular ($p<0,01$) y la expresión de Ki67 ($p<0,05$). Con el fin de asegurar que estos efectos no se deben a las características intrínsecas de la voz del participante, se diseñó la condición “estímulo no emocional” en la cual el mismo sujeto registró las primeras 300 palabras de “El Quijote” ($p=0,22$). Así mismo, se sintetizó un nuevo estímulo “voz emocional sintetizada” a partir del texto emocional sin característica acústico-afectiva asociada ($p=0,44$). En conclusión, los resultados preliminares apuntan a la posibilidad de que las características físico-emocionales de la voz humana podrían influir significativamente sobre la proliferación celular y la expresión de Ki67 de la línea celular 661W.

Consideramos la posibilidad de que los efectos sobre la proliferación y la expresión proteica descritos puedan ser específicos de la línea celular 661W. Sin embargo, la literatura muestra cómo diferentes líneas celulares en humanos, ratones, levaduras o bacterias son sensibles a las ondas mecánicas [42], [44], [55]–[58], por lo que resultaría poco probable. Es necesaria más investigación al respecto.

La principal limitación de esta prueba piloto, es la necesidad de ampliar la muestra ($n=1$). También sería aconsejable aumentar el número de estímulos acústico-emocionales (ira, miedo o alegría). Con todo, y atendiendo a los resultados preliminares, el estudio del efecto de las ondas acústico-emocionales sobre la biología celular es un campo inexplorado que podría arrojar luz en la comprensión de cómo la cognición humana interacciona con la biología a través de las leyes de la física.

REFERENCIAS

- [1] C. Darwin, *The Expression of the Emotions in Man and Animals*. Cambridge University Press, 2013.
- [2] P. Ekman, “Are there basic emotions?,” *Psychol Rev*, vol. 99, no. 3, pp. 550–553, 1992.
- [3] K. Scherer, T. Johnstone, and G. Klasmeyer, *Vocal expression of emotion*. Handbook of affective sciences. Oxford University Press, 2003. Accessed: Jun. 27, 2023. [Online]. Available: <https://psycnet.apa.org/record/2009-07773-023>.
- [4] J. A. Russell, J. A. Bachorowski, and J. M. Fernández-Dols, “Facial and Vocal Expressions of Emotion,” *Annu Rev Psychol*, vol. 54, pp. 329–349, 2003.
- [5] R. Banse and K. R. Scherer, “Acoustic profiles in vocal emotion expression,” *J Pers Soc Psychol*, vol. 70, no. 3, pp. 614–636, 1996.
- [6] S. P. Whiteside, “Acoustic characteristics of vocal emotions simulated by actors,” *Percept Mot Skills*, vol. 89, no. 3 Pt 2, pp. 1195–1208, 1999.
- [7] A. Schirmer and R. Adolphs, “Emotion Perception from Face, Voice, and Touch: Comparisons and Convergence,” *Trends Cogn Sci*, vol. 21, no. 3, pp. 216–228, Mar. 2017.
- [8] P. Ekman, “Facial expressions of emotion: an old controversy and new findings,” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 335, no. 1273, pp. 63–69, 1992.
- [9] T. Johnstone and K. R. Scherer, *Vocal communication of emotion*. New York: In Handbook of Emotions. Guilford Press, 2000.
- [10] K. R. Scherer, *Vocal correlates of emotional arousal and affective disturbance*. In H. Wagner & A. Manstead (Eds.), *Handbook of social psychophysiology*. John Wiley & Sons, 1989.
- [11] M. Pietrowicz, M. Hasegawa-Johnson, and K. G. Karahalios, “Acoustic correlates for perceived effort levels in male and female acted voices,” *J Acoust Soc Am*, vol. 142, no. 2, pp. 792–811, Aug. 2017.
- [12] S. R. Kadir and P. Alku, “Glottal features for classification of phonation type from speech and neck surface accelerometer signals,” *Comput Speech Lang*, vol. 70, p. 101232, Nov. 2021.
- [13] I. Grichkovtsova, M. Morel, and A. Lacheret, “The role of voice quality and prosodic contour in affective speech perception,” *Speech Commun*, vol. 54, no. 3, pp. 414–429, Mar. 2012.
- [14] C. Gobl and A. Ní Chasaide, “The role of voice quality in communicating emotion, mood and attitude,” *Speech Commun*, vol. 40, no. 1–2, pp. 189–212, Apr. 2003.
- [15] P. Birkholz, L. Martin, K. Willmes, B. J. Kröger, and C. Neuschaefer-Rube, “The contribution of phonation type to the perception of vocal emotions in German: an articulatory synthesis study,” *J Acoust Soc Am*, vol. 137, no. 3, pp. 1503–1512, Mar. 2015.
- [16] J. Kuang and M. Liberman, “Integrating Voice Quality Cues in the Pitch Perception of Speech and Non-speech Utterances,” *Front Psychol*, vol. 9, no. NOV, Nov. 2018.
- [17] D. N. Honorof and D. H. Whalen, “Perception of pitch location within a speaker’s F0 range,” *J Acoust Soc Am*, vol. 117, no. 4 Pt 1, pp. 2193–2200, Apr. 2005.
- [18] C.-Y. Lee, L. Dutton, and G. Ram, “The role of speaker gender identification in relative fundamental frequency height estimation from multispeaker, brief speech segments,” *J Acoust Soc Am*, vol. 128, no. 1, pp. 384–388, Jul. 2010.
- [19] P. Lieberman and S. B. Michaels, “Some Aspects of Fundamental Frequency and Envelope Amplitude as Related to the Emotional Content of Speech,” *J Acoust Soc Am*, vol. 34, no. 7, pp. 922–927, Jul. 1962.
- [20] C. Sobin and M. Alpert, “Emotion in Speech: The Acoustic Attributes of Fear, Anger, Sadness, and Joy,” *Journal of Psycholinguistic Research* 1999 28:4, vol. 28, no. 4, pp. 347–365, 1999.
- [21] P. N. Juslin and P. Laukka, “Communication of Emotions in Vocal Expression and Music Performance: Different Channels, Same Code?,” *Psychol Bull*, vol. 129, no. 5, pp. 770–814, Sep. 2003.
- [22] P. N. Juslin and K. R. Scherer, *Vocal expression of affect*. In J. A. Harrigan, R. Rosenthal, & K. R. Scherer (Eds.), *The new handbook of methods in nonverbal behavior research*. Oxford University Press, 2005.
- [23] C. Breitenstein, D. Van Lancker, and I. Daum, “The contribution of speech rate and pitch variation to the perception of vocal emotions in a German and an American sample,” *Cognition and Emotion*, vol. 15, no. 1, pp. 57–79, 2010.
- [24] A. Davletcharova, S. Sugathan, B. Abraham, and A. P. James, “Detection and Analysis of Emotion from Speech Signals,” *Procedia Comput Sci*, vol. 58, pp. 91–96, Jan. 2015.
- [25] D. France, R. Shiavi, Silverman. D, Silverman. M, and Wilkes. DM, “Acoustical properties of speech as indicators of depression and suicidal risk,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 47, no. 7, pp. 829–837, 2000.
- [26] W. Pan *et al.*, “Re-examining the robustness of voice features in predicting depression: Compared with baseline of confounders,” *PLoS One*, vol. 14, no. 6, Jun. 2019.
- [27] A. Ozdas, R. G. Shiavi, S. E. Silverman, M. K. Silverman, and D. M. Wilkes, “Investigation of vocal jitter and glottal flow spectrum as possible cues for depression and near-term suicidal risk,” *IEEE Trans Biomed Eng*, vol. 51, no. 9, pp. 1530–1540, Sep. 2004.
- [28] N. Cummins, J. Epps, M. Breakspear, and R. Goecke, “An investigation of depressed speech detection: Features and normalization,” *Proceedings of the Annual Conference of*

- the International Speech Communication Association, *INTERSPEECH*, pp. 2997–3000, 2011.
- [29] Y. Kim and Y. Choi, “A Cross-Language Study of Acoustic Predictors of Speech Intelligibility in Individuals With Parkinson’s Disease,” *J Speech Lang Hear Res*, vol. 60, no. 9, p. 2506, Sep. 2017.
- [30] G. Weismer, J. S. Laures, J. Y. Jeng, R. D. Kent, and J. F. Kent, “Effect of speaking rate manipulations on acoustic and perceptual aspects of the dysarthria in amyotrophic lateral sclerosis,” *Folia Phoniatr Logop*, vol. 52, no. 5, pp. 201–219, 2000.
- [31] G. Weismer, J. Y. Jeng, J. S. Laures, R. D. Kent, and J. F. Kent, “Acoustic and intelligibility characteristics of sentence production in neurogenic speech disorders,” *Folia Phoniatr Logop*, vol. 53, no. 1, pp. 1–18, 2001.
- [32] N. Cullum and Z. Liu, “Therapeutic ultrasound for venous leg ulcers,” *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 5, no. 5, May 2017.
- [33] S. Johnson, “Low-frequency ultrasound to manage chronic venous leg ulcers,” *Br J Nurs*, vol. 12, no. 19 Suppl, 2003.
- [34] P. G. De Deyne and M. Kirsch-Volders, “In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts,” *Phys Ther*, vol. 75, no. 7, pp. 629–634, 1995.
- [35] J. C. Lee Ying, J. Dayou, and C. K. Phin, “Experimental Investigation on the Effects of Audible Sound to the Growth of *Escherichia coli*,” *Mod Appl Sci*, vol. 3, no. 3, Feb. 2009.
- [36] N. Lestard, R. Valente, A. Lopes, and M. A. M. Capella, “Direct effects of music in non-auditory cells in culture,” *Noise Health*, vol. 15, no. 66, pp. 307–314, Sep. 2013.
- [37] C. D. Lin *et al.*, “Sounds Stimulation on In Vitro HLI Cells: A Pilot Study and a Theoretical Physical Model,” *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 1–22, Jan. 2021.
- [38] H. C. Zhao, J. Wu, B. S. Xi, and B. C. Wang, “Effects of sound-wave stimulation on the secondary structure of plasma membrane protein of tobacco cells,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 25, no. 1, pp. 29–32, May 2002.
- [39] H. C. Zhao *et al.*, “Effect of sound stimulation on *Dendranthema morifolium* callus growth,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 29, no. 2–3, pp. 143–147, Jun. 2003.
- [40] N. R. Lestard and M. A. M. Capella, “Exposure to Music Alters Cell Viability and Cell Motility of Human Nonauditory Cells in Culture,” *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2016, 2016.
- [41] N. Sarvaiya and V. Kothari, “Audible sound in form of music can influence microbial growth, metabolism and antibiotic susceptibility,” *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, vol. Volume 2, no. Issue 6, Apr. 2017.
- [42] T. Mohammed, M. F. Murphy, F. Lilley, D. R. Burton, and F. Bezombes, “The effects of acoustic vibration on fibroblast cell migration,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 69, pp. 1256–1262, Dec. 2016.
- [43] Y. Choi, J. E. Park, J. S. Jeong, J. K. Park, J. Kim, and S. Jeon, “Sound Waves Induce Neural Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via Ryanodine Receptor-Induced Calcium Release and Pyk2 Activation,” *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 180, no. 4, pp. 682–694, Oct. 2016.
- [44] M. Kumeta, D. Takahashi, K. Takeyasu, and S. H. Yoshimura, “Cell type-specific suppression of mechanosensitive genes by audible sound stimulation,” *PLoS One*, vol. 13, no. 1, p. e0188764, Jan. 2018.
- [45] D. Kwak, T. Combriat, C. Wang, H. Scholz, A. Danielsen, and A. R. Jensenius, “Music for Cells? A Systematic Review of Studies Investigating the Effects of Audible Sound Played Through Speaker-Based Systems on Cell Cultures,” *Music and Science*, vol. 5, Mar. 2022.
- [46] R. S. Lazarus and B. N. Lazarus, *Passion and Reason: Making Sense of Our Emotions*. New York (USA): Oxford University Press, 1994.
- [47] M. E. McCullough, R. A. Emmons, and J.-A. Tsang, “The grateful disposition: a conceptual and empirical topography,” *J Pers Soc Psychol*, vol. 82, no. 1, pp. 112–127, Jan. 2002.
- [48] N. M. Lambert and F. D. Fincham, “Expressing gratitude to a partner leads to more relationship maintenance behavior,” *Emotion*, vol. 11, no. 1, pp. 52–60, Feb. 2011.
- [49] S. M. Toepfer and K. Walker, “Letters of gratitude: Improving well-being through expressive writing,” *J Writ Res*, vol. 1, no. 3, pp. 181–198, Nov. 2009.
- [50] F. Triaud, D. H. Clenet, Y. Cariou, T. Le Neel, D. Morin, and A. Truchaud, “Evaluation of Automated Cell Culture Incubators,” *SLAS Technol*, vol. 8, no. 6, pp. 82–86, Dec. 2003.
- [51] E. Tan, X. Q. Ding, A. Saadi, N. Agarwal, M. I. Naash, and M. R. Al-Ubaidi, “Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice,” *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 45, no. 3, pp. 764–768, Mar. 2004.
- [52] Z. Sayyad, K. Sirohi, V. Radha, and G. Swarup, “661W is a retinal ganglion precursor-like cell line in which glaucoma-associated optineurin mutants induce cell death selectively,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.
- [53] I. Mickuviene, V. Kirveliėne, and B. Juodka, “Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro,” *Toxicology in Vitro*, vol. 18, no. 5, pp. 639–648, 2004, doi: 10.1016/j.tiv.2004.02.001.
- [54] X. Sun and P. D. Kaufman, “Ki-67: more than a proliferation marker,” *Chromosoma*, vol. 127, no. 2, p. 175, Jun. 2018.
- [55] N. Navarro-Fernández, “Caracterización y cuantificación de la influencia de la música como agente físico sobre el comportamiento de células madre neurales embrionarias en cultivo,” Universidad de Valladolid, 2010. Accessed: Jul. 04, 2023. [Online]. Available: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=295435&info=resumen&idioma=SPA>
- [56] R. B. M. Aggio, V. Obolonkin, and S. G. Villas-Bôas, “Sonic vibration affects the metabolism of yeast cells growing in liquid culture: A metabolomic study,” *Metabolomics*, vol. 8, no. 4, pp. 670–678, Aug. 2012.
- [57] G. Shaobin *et al.*, “A pilot study of the effect of audible sound on the growth of *Escherichia coli*,” *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 78, no. 2, pp. 367–371, Jul. 2010.
- [58] H. Jones, L. Feth, D. Rumpf, A. Hefti, and A. Mariotti, “Acoustic energy affects human gingival fibroblast proliferation but leaves protein production unchanged,” *J Clin Periodontol*, vol. 27, no. 11, pp. 832–838, Nov. 2000.