

# Mechanical Bioreactor for Tissue-Derived Extracellular Matrix Scaffolds Recellularization

Lucía C. Majul<sup>1</sup> Eduardo G. Nieva<sup>1,2</sup> and Nancy A. Salvatierra<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup>IIByT- CONICET.

**Abstract**— Tissue engineering applies the principles of engineering and life sciences towards the development of functional engineered tissue. The complexity involved in *in vivo* biological systems creates a need for bioreactors, which can closely mimic the cells microenvironment. Some cells are well known to have the ability to sense and respond to mechanical stimuli, and a certain level of control over cell growth and differentiation may be accomplished through stretch stimulation. This work involves design, development and implementation of a stretching device that induces uniaxial mechanical strain in recellularized native extracellular matrix scaffolds. The device structure was obtained by using the 3D printing technology, and cell stretching was accomplished via nut-spindle system. Porcine heart matrices, which served as mechanical support for the cells, were obtained by implementing an immersing decellularization protocol. The protocol's effectiveness was verified through hematoxylin-eosin staining, and then a MTT cytotoxicity assay was performed. The latter brought out a satisfying result, showing cell viability percentage above 70%. The cell-stretcher test experiment involved 120 h, and included mechanical stimulation of a native extracellular matrix scaffold, seeded with Vero cells. Cell adhesion was verified with hematoxylin-eosin staining, while labeling the sample with fluorescein diacetate and propidium iodide showed the presence of metabolically active cells after mechanical stimulation.

**Keywords**— Tissue engineering, extracellular matrix, scaffold, bioreactor, cell culture, stretch chamber.

**Resumen**— La ingeniería de tejidos es una disciplina que tiene como objetivo principal la obtención de tejido bioartificial funcional. El logro de esta meta es en parte posible si se utiliza un biorreactor que provea señales fisiológicamente relevantes durante el cultivo celular sobre andamios, manteniendo condiciones controladas en el medio de cultivo. En algunos tipos celulares, un cierto nivel de control sobre el crecimiento y la diferenciación celular puede alcanzarse al aplicar estímulos mecánicos. El presente trabajo contempla el diseño, desarrollo e implementación de un biorreactor mecánico uniaxial para recelularización de matrices naturales. La estructura del mismo se obtuvo utilizando la tecnología de impresión 3D, y sobre ella se montaron el actuador, el control electrónico y una membrana flexible destinada a ser estirada cíclicamente por la acción de un sistema tuerca-husillo. Se trabajó con matrices naturales de miocardio porcino como andamios de soporte para las células, y para su obtención se puso en práctica un protocolo de descelularización por inmersión. Se verificó la eficacia del protocolo de descelularización mediante microscopía óptica usando tinción con hematoxilina-eosina. Luego, la matriz obtenida fue sometida a un ensayo de citotoxicidad con MTT, obteniendo un porcentaje de viabilidad superior al 70%. El experimento de prueba del biorreactor se realizó a lo largo de 120 h; se estimuló mecánicamente una matriz previamente recelularizada con la línea celular Vero. Al finalizar este período, se verificó la adherencia celular mediante microscopía óptica usando la tinción de hematoxilina-eosina, y microscopía de fluorescencia con diacetato de fluoresceína e ioduro de propidio evidenció la presencia de células metabólicamente activas luego de la estimulación mecánica.

**Palabras clave**— Ingeniería de tejidos, matriz extracelular, andamio, biorreactor, cultivo celular, cámara de estiramiento.

## I. INTRODUCCIÓN

El principal desafío de la ingeniería de tejidos es imitar lo que ocurre en la biología para lograr la regeneración de tejido dañado, siendo hoy en día uno de sus principales objetivos el restablecimiento de la función miocárdica después de un infarto. Debido a la complejidad estructural y funcional del corazón, la ingeniería tisular cardíaca centra la mirada en la obtención de parches de tejido cardíaco, para lograr en un futuro la creación del órgano completo. Estos parches, obtenidos a través de la combinación de células adecuadas con andamios tridimensionales, deben ser aptos para la implantación, tener la capacidad de integrarse con el resto del órgano receptor y responder sincrónicamente con el mismo,

promoviendo además la angiogénesis para asegurar la supervivencia celular a largo plazo [1]. Para ello, es fundamental la existencia de estímulos mecánicos que imiten la actividad cardíaca, por lo que los biorreactores mecánicos han tomado importancia dentro de este campo. Parámetros del estiramiento como el modo (uniaxial, biaxial), la magnitud, la velocidad, la frecuencia, la forma de onda (sinusoidal, rampa, estática), y la inserción de períodos de reposo, inducen efectos reguladores a nivel celular significativos [2].

El presente trabajo plantea el diseño, desarrollo e implementación de un biorreactor a escala de laboratorio para estimulación mecánica uniaxial de matrices porcinas recelularizadas, evaluando posteriormente el resultado global obtenido a través de un experimento de prueba.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Especificaciones técnicas.

Se definieron en primer lugar las especificaciones y funcionalidad esperada del dispositivo, a partir de las características de los equipos disponibles en el mercado y las necesidades del usuario final. Se determinó que el modo de estiramiento del biorreactor sería uniaxial, con capacidad para tres cámaras de estiramiento de 4 cm<sup>2</sup> de área de cultivo cada una; rango del estiramiento 1-12% (0,2-2,4 mm) con paso de 0,5% (0,1 mm); velocidad de estiramiento constante, frecuencia 0,1-2 Hz, forma de onda cuadrada, con período de reposo de igual duración que el período de retención del estiramiento, y posibilidad de detener el estiramiento en cualquier momento que se necesite acceder a los pocillos.

### B. Sistema de actuación y control electrónico.

La deformación de los pocillos se logró con un actuador eléctrico, utilizando un motor paso a paso (PaP) unido a un sistema tuerca-husillo, encargado de desplazar una pieza móvil ligada a un extremo de las cámaras de estiramiento, produciendo así su deformación. El extremo opuesto de las cámaras de estiramiento se atornilló en una pieza fija, donde además se empotraron el sensor de posición de Efecto Hall A3144 [3] y el sensor de temperatura y humedad DHT22 [4].

Se eligió trabajar con el motor PaP JK42HS34-0404 [5] para inducir movimiento giratorio en un husillo trapezoidal ACME de 8 mm de diámetro. Una tuerca trapezoidal con paso de 2 mm y 4 entradas se fijó en la pieza móvil para transformar el movimiento giratorio en un desplazamiento longitudinal, provocando así el estiramiento de los pocillos. La junta entre el motor PaP y el husillo se realizó con un acoplamiento flexible de 8x5 mm.

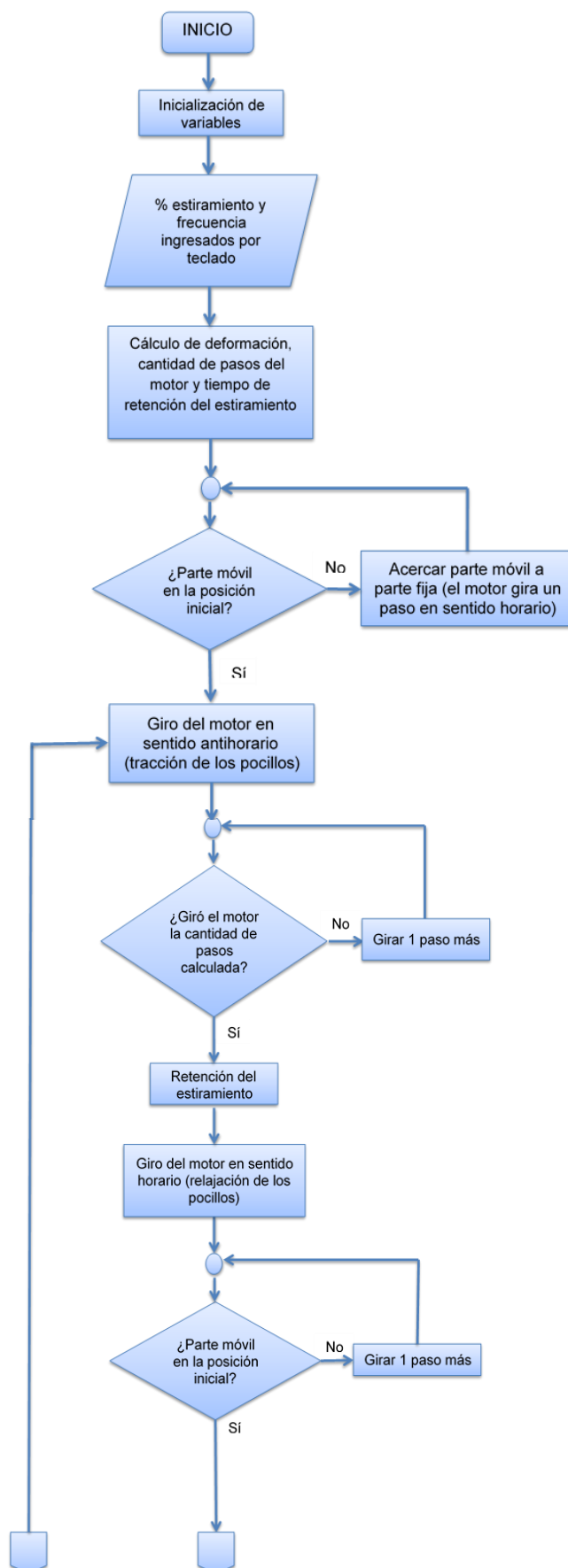
El control de la corriente entregada al motor PaP se realizó con el *driver* A4988 de *Stepsticks* [6]. El sensor A3144 fue posicionado de tal manera de cumplir la función de sensor de final de carrera. El mismo actuó en conjunto con un imán de neodimio adherido en la ranura de parte móvil diseñada para tal fin.

Se diseñó un *encoder* incremental, para aquellas circunstancias en las que el motor pierde pasos, lo que produciría un estiramiento del pocillo erróneo, alterando las condiciones del protocolo definido para el experimento. Para ello, se diagramó un disco con zonas opacas y huecas alternadas y equidistantes, de diámetro interno igual al de la varilla roscada. El mismo fue impreso en 3D con filamento de ácido poliláctico (PLA) y acoplado a un circuito óptico de lectura fijo, constituido por un emisor infrarrojo y un fototransistor. La resolución del sensor puede observarse en la ecuación siguiente:

$$N = \frac{\pi \times 23 \text{ mm}}{2 \times 0,9 \text{ mm}} = 40,14 \approx 40 \quad (1)$$

de la cual se interpreta que el disco detecta 40 posiciones en una vuelta de 360 grados de la varilla roscada, lo que equivale a 200 pasos dados por el motor PaP. El error en la posición detectado por el *encoder* es por lo tanto  $\pm 5$  pasos, lo que equivale a  $\pm 0,2$  mm de desplazamiento longitudinal. Desplazamientos menores a 0,2 mm son controlados exclusivamente por los pulsos que la placa Arduino envía al *driver*, sin recibir información del *encoder*.

El control del *driver* y del funcionamiento general del biorreactor se realizó a través de la plataforma de *hardware* Arduino Uno R3 [7]; la programación de este último se llevó a cabo en el Entorno de Desarrollo Integrado (IDE) de Arduino. La lógica de programación simplificada puede observarse en la Fig 1.



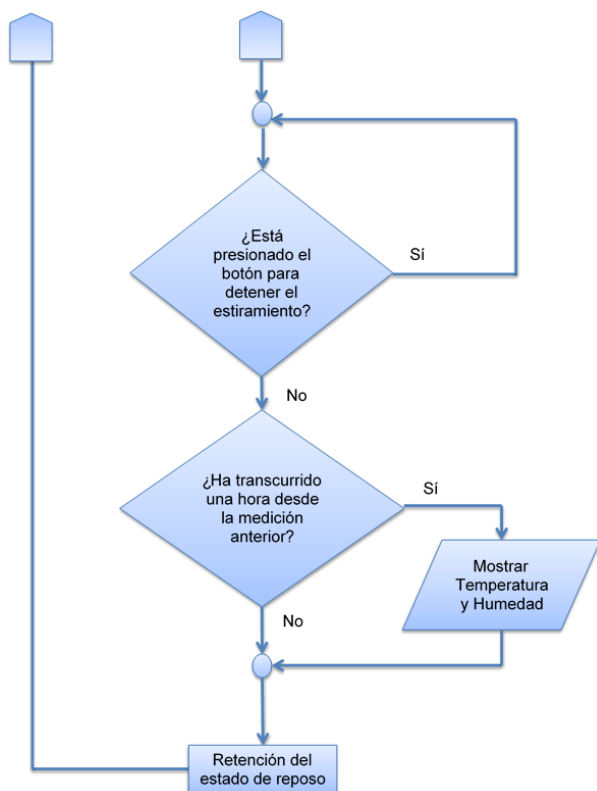


Fig. 1: Lógica de programación del microcontrolador.

C. Comunicación inalámbrica.

Para facilitar la configuración de los parámetros del biorreactor y hacer un seguimiento del comportamiento del mismo desde el exterior de la sala de cultivo, se utilizó el módulo Bluetooth HC-05 [8], configurado como esclavo.

D. Estructura.

Una vez definido el sistema de actuación y de control del movimiento, se procedió al diseño de la estructura del biorreactor utilizando un software de diseño asistido por computadora (CAD). Se obtuvieron dos piezas, una de ellas fija (Fig. 2) y la otra móvil (Fig. 3), las cuales se imprimieron 3D utilizando PLA.

La pieza fija se diseñó además con orificios en las paredes laterales para la introducción del sensor de final de carrera y el de temperatura y humedad. La ranura para el imán de neodimio se confeccionó en la parte móvil, del mismo lado y a la misma altura del extremo superior del orificio de la parte fija.

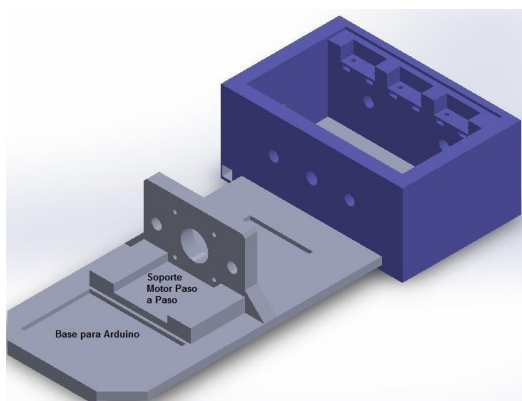


Fig. 2: Parte fija del biorreactor.

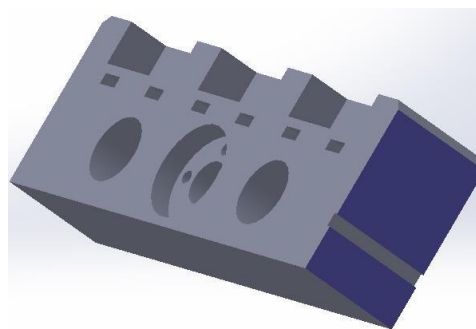


Fig. 3: Parte móvil del biorreactor.

Para resguardar las células de la contaminación y a la vez permitir la ventilación y la difusión de CO<sub>2</sub> hacia el medio celular, se diseñó una tapa utilizando un software CAD, y se obtuvo por corte laser de una plancha de acrílico.

Se diseñó también un resguardo móvil deslizante para proteger todo el control electrónico del biorreactor e impedir el acceso al mismo (Fig. 4). Esta pieza fue dividida en dos partes para mayor facilidad del montaje final del dispositivo y acceso a los componentes para su reparación y reemplazo ocasional en el futuro.

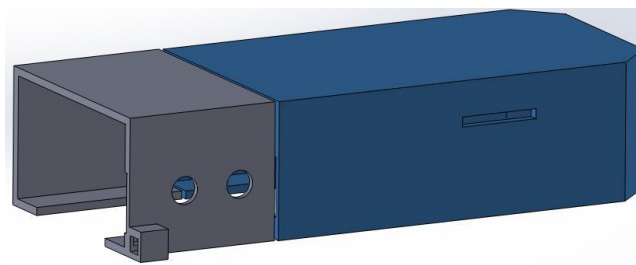


Fig. 4: Resguardo móvil.

E. Membranas flexibles.

Se fabricaron las cámaras de estiramiento de 4cm<sup>2</sup>, utilizando polivinilsiloxano (PVS) de consistencia fluida 3M Imprint II de baja viscosidad [9]. Las mismas se obtuvieron por el método de colada, con un molde negativo diseñado en un software CAD, con las medidas de las cámaras de 4 cm<sup>2</sup> comerciales [10]. El molde fue luego impreso en 3D utilizando el filamento Polysmooth PVB 3D, y posteriormente se utilizó una unidad de limpieza (Polysher; Poly-maker; China) para eliminar las capas de impresión.

F. Cultivo celular.

La línea celular Vero fue cultivada *in vitro* como monocapa adherente en placas tipo Petri de 60 mm de diámetro. Las células fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y mantenidas con medio de cultivo celular completo, con la siguiente formulación: Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (Sigma), 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Internegocios S.A), 10.000 UI/ml de penicilina y 10.000 µg/ml de estreptomycin (antibióticos). Cada vez que se alcanzó la confluencia del cultivo, se efectuó el pasaje o repique. Para ello, se llevó a cabo el procedimiento de tripsinización, para el cual se utilizó tripsina 0,25% en EDTA (Gibco).

El recuento de células en suspensión luego del proceso de tripsinización se realizó utilizando un hematocitómetro o cámara de Neubauer, y para diferenciar células vivas de muertas bajo microscopio se utilizó azul de tripano (0,4% en agua desionizada). Finalizado el recuento, se sembró una densidad de 12.000 células/cm<sup>2</sup> sobre la placa de Petri.

### G. Obtención y desculturización de miocardio.

Las matrices naturales (MEC) se obtuvieron a través de la desculturización del miocardio correspondiente a la pared del ventrículo izquierdo de corazones de cerdo adultos. Los corazones fueron congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 h. Posteriormente, se descongelaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se obtuvieron cortes de las paredes ventriculares de  $900\text{ }\mu\text{m}$  de espesor. Estas piezas fueron luego sometidas a un proceso de desculturización por inmersión, siguiendo un protocolo basado en lo propuesto por Mirsadraee *et al* [11]. Para ello, en primer lugar, se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 h. Luego se descongelaron a temperatura ambiente para ayudar a la lisis celular, y se procedió siguiendo el flujo de trabajo mostrado en la Fig. 5, utilizando dodecil sulfato sódico (SDS) (1% en agua desionizada) como detergente iónico.

Se desinfectó la MEC resultante utilizando ácido peracético (0,2% en agua desionizada), y luego se mantuvo en PBS y antibióticos (ATB), con la misma formulación utilizada para el medio de cultivo celular completo.

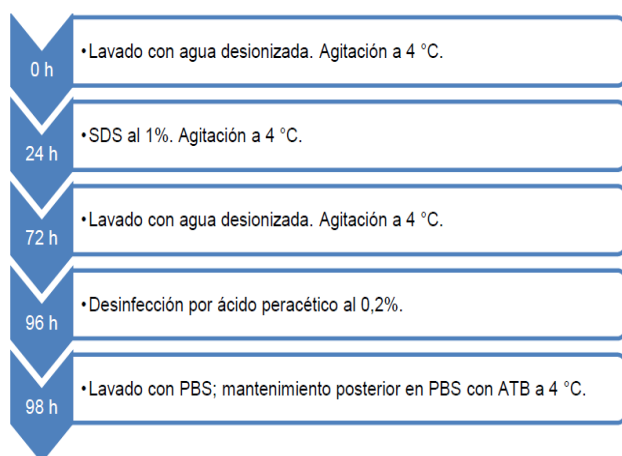


Fig. 5: Flujo de trabajo para la desculturización por inmersión y posterior desinfección.

Las MEC fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), para verificar la ausencia de núcleos, la conservación del árbol vascular y la estructura tridimensional del tejido.

### H. Ensayo de citotoxicidad.

Para determinar la citotoxicidad del PVS 3M Imprint II de baja viscosidad y de la MEC se realizó el ensayo de MTT, de acuerdo con la Norma ISO 10993-5 [12].

Los materiales a ensayar se cortaron en pequeñas piezas, según lo indicado en la Norma ISO 10993-12 [13], y se desinfectaron por inmersión en ácido peracético al 0,2%. La extracción se realizó en medio de cultivo celular completo por 24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en una atmósfera controlada de 5% de  $\text{CO}_2$ . La Fig. 6 muestra de manera resumida el protocolo del ensayo.

#### I. Experiencia de prueba

Previo a su introducción en la sala de cultivo, la estructura del biorreactor y su soporte se desinfectaron con monopersulfato de potasio 20%. Los componentes electrónicos fueron irradiados con luz UV durante 15 min utilizando una lámpara Philips Germicida G15T8, y los tornillos de sujeción de la cámara de estiramiento se desinfectaron utilizando etanol al 70% con agitación durante 15 min. Las cámaras de estiramiento se

desinfectaron con ácido peracético al 0,2% con agitación durante 1 h.

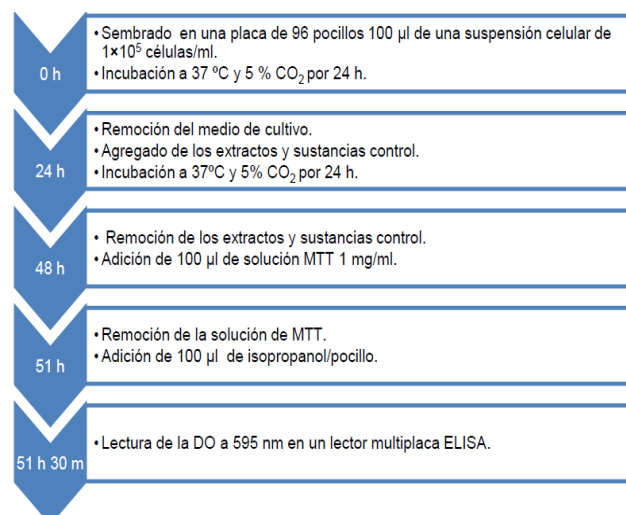


Fig. 6: Flujo de trabajo para la prueba de MTT.

Las matrices conservadas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  se sumergieron en ácido peracético al 0,2% y posteriormente se lavaron con PBS estéril. A continuación, dos de ellas (elegidas aleatoriamente para ser sometidas a estiramiento estático y estiramiento cíclico) fueron posicionadas sobre el pocillo de la cámara de estiramiento, utilizando agujas 30 G; otra matriz (control) se posicionó sobre una placa tipo Petri de 60 mm de diámetro y se dejó secar bajo campana junto a las dos anteriores durante 1 h (Fig.7).

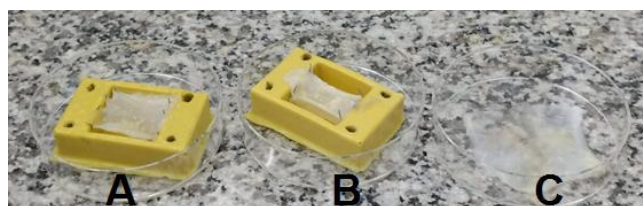


Fig. 7: matrices secando bajo campana. (A) Estiramiento cíclico. (B) Estiramiento estático. (C) Control.

Aplicando técnicas de cultivo tridimensional, se sembraron  $100\text{ }\mu\text{l}$  de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células Vero/ml en cada una de las matrices y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$ . Al cabo de 30 min se agregó medio de cultivo completo (Figs. 8 y 9) y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$  por 48 h, para permitir la adherencia celular a la matriz. Transcurrido ese tiempo, la matriz posicionada sobre el biorreactor fue estimulada mecánicamente al 5% y a una frecuencia de 1 Hz por 48 h.



Fig. 8: matrices de control y estiramiento estático recelularizadas.

Se utilizaron dos fluorocromos aplicados conjuntamente para determinar la presencia y supervivencia celular al cabo de las 120 h de duración del experimento: el diacetato de

fluoresceína ( $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  de MEC) y el yoduro de propidio ( $25 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  de MEC a  $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ). En primera instancia se lavaron las matrices con PBS y se adicionaron los fluorocromos, dejándolas reposar posteriormente por 15 min a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad. Luego se procedió a realizar un lavado con PBS y finalmente se observaron las muestras bajo microscopio confocal de fluorescencia (IX83; Olympus; Japón).

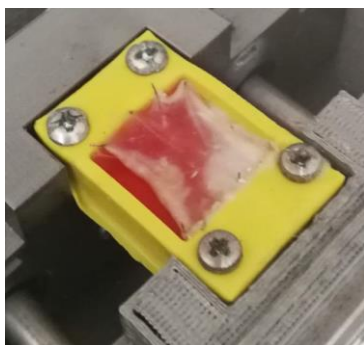


Fig. 9: Matriz de estiramiento cíclico recelularizada.

Por otro lado, las matrices recelularizadas se sometieron a la técnica de tinción histológica hematoxilina-eosina (H&E), de manera de poder ser comparadas contra una matriz descelularizada.

### III. RESULTADOS

#### A. Montaje de componentes y comportamiento del sistema

Los componentes electrónicos necesarios para la creación del estímulo mecánico y el monitoreo de las condiciones de cultivo se interconectaron y montaron en una placa de circuito integrado (PCB) en forma de *shield*, y posteriormente fueron posicionados en la estructura del biorreactor.

La evaluación del sistema de estiramiento incluyó, en primer lugar, una verificación del comportamiento del motor PaP, analizando si el mismo soportaba la tensión ejercida por las cámaras de estiramiento en sentido contrario, a través del monitoreo por *encoder* incremental de los pasos efectivamente dados en cada ciclo. Se decidió trabajar con una sola cámara, ya que la elección del motor se efectuó en base a las propiedades mecánicas del polidimetilsiloxano (PDMS), que es el biomaterial más difundido y validado para su aplicación en biorreactores mecánicos [14], [15]. Este material tiene un módulo de elasticidad considerablemente menor al del PVS, y por lo tanto menor rigidez que el elastómero utilizado en este trabajo. Esto se manifestó cuando al ingresar un determinado porcentaje de estiramiento, se midió un desplazamiento menor al calculado. Ante esta situación, se trazó una curva de calibración para aquellos casos en los que el biorreactor se utilice con una cámara de estiramiento de PVS (Fig. 10), determinando los valores de estiramiento que deben ser ingresados en la configuración para obtener la deformación buscada. Para ello, se configuraron distintos porcentajes de estiramiento a baja frecuencia ( $0,1 \text{ Hz}$ ) y se midió con un calibre digital la relación de estiramiento para cada caso. Se determinaron los porcentajes de estiramiento que debían ingresarse al sistema para conseguir un estiramiento del 5%, 7,5% y 10%. Luego, se graficaron

estos puntos y se trazó una línea de tendencia, obteniendo de esta manera la curva buscada.

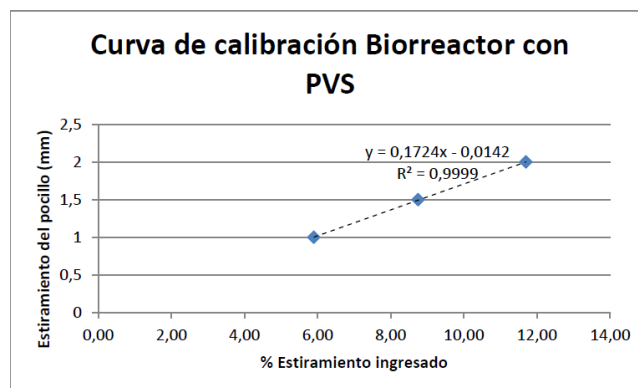


Fig. 10: curva de calibración del biorreactor con cámaras de estiramiento de PVS.

#### B. Descelularización del miocardio.

Luego de la aplicación del protocolo de descelularización, se obtuvieron parches de MEC, en los cuales pudo apreciarse macroscópicamente la conservación del árbol vascular, fundamental para la futura siembra celular y la supervivencia del tejido en el tiempo. La tinción de H&E evidenció la ausencia de células y núcleos en la matriz descelularizada (Fig. 11 y 12).

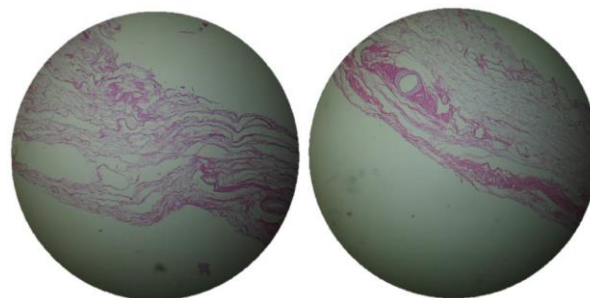


Fig. 11: Matriz descelularizada (10x).

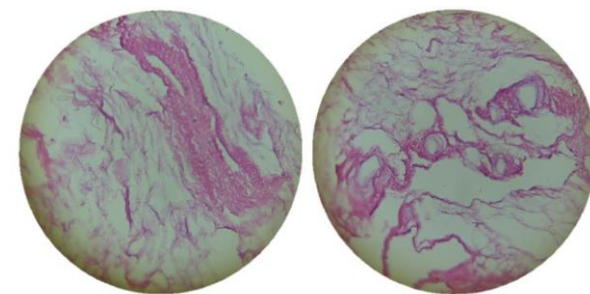


Fig. 12: Matriz descelularizada (40x).

#### C. Viabilidad celular.

Los resultados de la prueba de MTT se muestran en la Fig. 13; tanto para la MEC como para el PVS se obtuvieron porcentajes de viabilidad superiores al 70% (Fig. 13), concluyendo que estos materiales no presentan potencial citotóxico.

#### D. Experimento de prueba.

Durante estimulación cíclica de la MEC recelularizada seleccionada para tal fin, se monitoreó la temperatura y humedad del recinto donde se cultivó la misma. La temperatura medida osciló entre  $35,7 \pm 0,5^\circ\text{C}$  y  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , mientras que la humedad relativa osciló entre  $91,1 \pm 2\%$  y  $91,7 \pm 2\%$ .

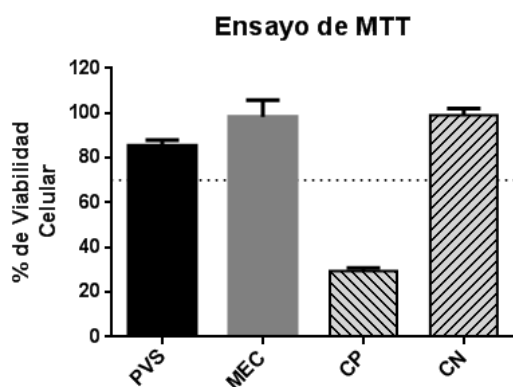


Fig. 13: Citotoxicidad de PVS y MEC determinado por ensayo de MTT (media aritmética  $\pm$  SEM). CP: control positivo. CN: control negativo.

Las matrices sometidas a experimentación fueron evaluadas por microscopía confocal de fluorescencia y microscopía óptica para el caso de los preparados teñidos con H&E (Figs.14 y 15). Las imágenes correspondientes a la tinción con H&E acusaron adhesión celular al andamio en las tres matrices sometidas a experimentación. Tanto para la MEC control y la MEC sometida a estiramiento cíclico se observa una mayor proliferación celular que para el caso de la MEC sometida a estiramiento estático.

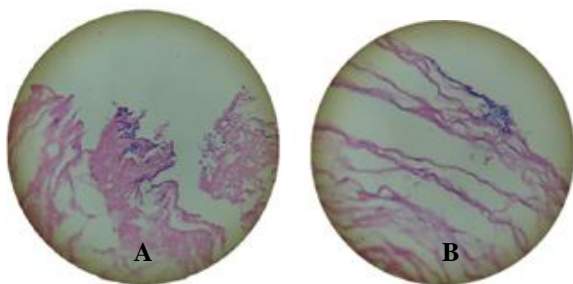


Fig. 14: (A) MEC recellularizada control (40x). (B) MEC recellularizada sometida a estiramiento estático (40x).

Las imágenes obtenidas del microscopio confocal correspondientes a la MEC recellularizada sometida a estiramiento cíclico muestra la presencia de células vivas y apoptóticas a lo largo de toda la profundidad de exploración. Se evidenció la penetración de células en la MEC hasta 53,46  $\mu$ m desde la superficie en la cual fueron sembradas. En la Fig. 16 puede observarse la imagen resultante de realizar una proyección a lo largo de toda la profundidad de exploración, evidenciando la presencia de células teñidas con fluoresceína y con IP.

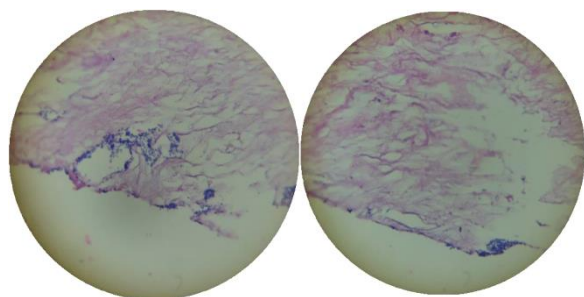


Fig. 15: MEC recellularizada sometida a estiramiento cíclico (40x).

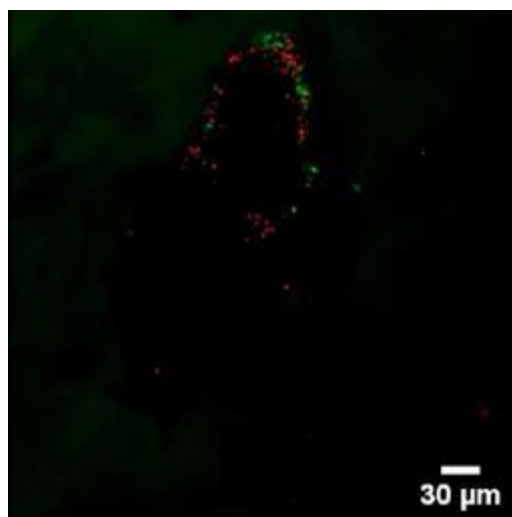


Fig. 16: MEC recellularizada, fusión de imágenes conteniendo las células penetradas por fluoresceína (verde) y las penetradas por yoduro de propidio (rojo).

#### IV. CONCLUSIONES

Se presentó el desarrollo un biorreactor mecánico para cultivo celular 3D, procurando simular las condiciones de temperatura, humedad, pH y fisiológicas tisulares para el correcto mantenimiento celular.

Los resultados obtenidos luego de la fase de experimentación permiten concluir que el biorreactor mecánico desarrollado permitió la adherencia celular; pudo evidenciarse la presencia de células metabólicamente activas y apoptóticas, pero será necesario optimizar y poner a punto técnicas de biología molecular, como ser la evaluación en la penetración de los compuestos. Además, se deberán definir exhaustivamente los parámetros de adquisición de las imágenes provenientes del microscopio confocal de manera de lograr el recuento de células sobrevivientes y células muertas, pudiendo expresar así resultados cuantitativos.

Como trabajo a futuro, se propone la implementación de una interfaz gráfica de usuario que facilite la interacción del investigador con el dispositivo y almacene los datos enviados desde el Arduino; se sugiere además llevar a cabo la caracterización mecánica de las cámaras de estiramiento de PVS para evaluar la factibilidad como material alternativo al PDMS para su uso en la ingeniería de tejidos. Por otro lado, sería interesante la implementación de protocolos de prueba variando el tiempo, la frecuencia y el porcentaje de estiramiento, y la caracterización del biorreactor utilizando tipos celulares específicos con respuesta a estimulación mecánica que ya hayan sido reportados en bibliografía.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores, Eduardo Gabriel Nieva y Nancy Alicia Salvatierra, por todo el apoyo y el tiempo dedicado a este proyecto; al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales por permitir llevar a cabo el mismo. A la compañía 3M y a su representante Claudio Lucero, y a todas aquellas personas que con soporte científico, técnico y humano han colaborado en la realización de este trabajo, especialmente a Ricardo Taborda, Nino Nobile, Mónica Sánchez e Iván Tavera Busso.

## REFERENCIAS

- [1] F. Wang and J. Guan, "Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 7-8, pp. 784-797, Jun. 2010.
- [2] B. D. Riehl, J.-H. Park, I. K. Kwon, and J. Y. Lim, "Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 288-300, Aug. 2012.
- [3] ALLEGRO, "A3141, A3142, A3143, and A3144: Sensitive Hall Effect Switches for High-Temperature Operation.," Disponible en: [www.allegromicro.com/~media/Files/Datasheets/A3141-2-3-4-%0ADatasheet.ashx?la=en](http://www.allegromicro.com/~media/Files/Datasheets/A3141-2-3-4-%0ADatasheet.ashx?la=en).
- [4] T. Liu, "Digital-output relative humidity & temperature sensor/module DHT22."
- [5] "1.8° 42mm Hybrid Stepper Motor-NEMA17."
- [6] "Pololu - A4988 Stepper Motor Driver Carrier." Disponible en: <https://www.pololu.com/product/1182>. Última visita: 20-Oct-2018.
- [7] "Arduino Uno Rev3." Disponible en: <https://store.arduino.cc/usa/arduino-uno-rev3>. Última visita: 20-Oct-2018.
- [8] "HC-05 Bluetooth module HC-05-Bluetooth to Serial Port Module," 2010.
- [9] 3M, "3M IMPRINT™ II VINYL POLISILOXANO CUERP O PESADO/LIVIANO Sistema de Material de Impresión- Perfil Técnico del Producto."
- [10] "Strex Cell Strain Instrument Catalog # ST-140-04 Serial # 20A-00013 User Manual."
- [11] S. Mirsadraee *et al.*, "Development and Characterization of an Acellular Human Pericardial Matrix for Tissue Engineering," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 4, pp. 763-773, 2006.
- [12] ISO, "ISO 10993, Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity." 2009.
- [13] ISO, "ISO 10993-12, Biological evaluation of medical devices -- Part 12: Sample preparation an reference materials." 2009.
- [14] S. Seriani *et al.*, "The cell-stretcher: A novel device for the mechanical stimulation of cell populations," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 87, no. 8, 2016.
- [15] J. H.-C. Wang and B. P. Thampatty, "Chapter 5 - Advances in tendon mechanobiology," in *Mechanobiology in Health and Disease*, S. W. Verbruggen, Ed. Academic Press, 2018, pp. 127-155.



**Lucia Candelaria Majul** es Ingeniera Biomédica de la Universidad Nacional de Córdoba (2019). Actualmente se desempeña como Asistente Técnica-Especialista Clínica en una empresa distribuidora de Producto Médico.