

Device for Cell Culture Under Variable Mechanical Stress by Controlling Deformation on its Substrate

L. Casal, C. Ruiz, and É. Hermida

Abstract—Mechanotransduction can enhance cell cultures when its substrate is subjected to dynamic strain. This paper presents the design and implementation of a device that applies variable mechanical stress on a flexible biocompatible substrate. An embedded system implements a closed-loop PID control that acts on a proportional valve, which regulates the negative pressure in a chamber, generated by a miniature vacuum pump. The top cover of the chamber is a membrane that stretches according to the generated vacuum and is used for cell culture. The elastic modulus of the produced membrane was 260 kPa, similar to soft biological tissue. The deformation of the membrane was quantified by image processing and a linear pressure-deformation relationship was achieved ($r > 0.99$). The controller was designed based on the identified valve's dynamic and it allowed variable deformations on the membrane with an amplitude of 20 % and a frequency of 2 Hz, selected by the user. The implemented device is PC independent and has a cost, size and weight almost two orders of magnitude lower than a similar commercial version.

Index Terms—Flexible substrate, Mechanical tension, Stress, strain, Deformation, Cell culture.

I. INTRODUCCIÓN

IN vivo, las células están expuestas a distintos tipos de esfuerzos mecánicos (de compresión, tracción, cizallamiento, etc.) que son determinantes en el comportamiento celular, ya sea en la embriogénesis y la fisiología de los tejidos, así como en diferentes enfermedades [1, 2]. Recientemente se ha comenzado a reconocer la necesidad de una mejor comprensión de los esfuerzos mecánicos sobre las moléculas individuales, tanto de forma aislada como dentro de las células vivas [3], efecto denominado mecanotransducción. En este sentido, aún no está claro cómo la célula procesa toda esta información a escala molecular y organiza una respuesta fisiológicamente relevante en el contexto de la arquitectura multiescala de todo nuestro cuerpo [4].

Este trabajo fue parcialmente financiado por la convocatoria INTERING 2015 a través de FUNINTEC bajo el proyecto titulado “Desarrollo de dispositivo para el cultivo celular in vitro en entornos mecánicamente activos”.

L. Casal (correo electrónico: lcasal@unsam.edu.ar), C. Ruiz y É. Hermida pertenecen al Laboratorio de Biomateriales, Biomecánica y Bioinstrumentación (LAB3BIO), UNSAM.

Hasta entonces, el estudio in vitro de las células se realizaba en condiciones mecánicamente pasivas, sobre sustratos (por ej. placas de Petri de vidrio) mucho más rígidos que cualquier matriz extracelular, limitando el comportamiento celular. Hoy en día, gracias a los avances tecnológicos y el trabajo multidisciplinario en áreas como la ingeniería de tejidos, es posible desarrollar sustratos que reproduzcan las características mecánicas de la matriz extracelular y sirvan como biorreactores para cultivar células en un entorno que simule el módulo elástico y las fuerzas mecánicas de un tejido particular [5].

En este sentido, existen sistemas que permiten cultivar células sobre membranas flexibles y aplicar estímulos mecánicos dinámicos, a partir de la deformación controlada del sustrato [6-8]. Por ejemplo, uno de ellos se basa en el uso de motores paso a paso que traccionan de los extremos del sustrato. Estos dispositivos son comercializados por STREX Cell Stretch System® [9, 10] y Menicon Life Science® [11], ambos de Osaka, Japón, y recientemente se presentó una versión de hardware abierto [7]. Por otro lado, la empresa Flexcell Culture Systems® [12] (Hillsborough, USA) comercializa un dispositivo que permite deformar al sustrato aplicando vacío en una de sus caras, Fig. 1, [13, 14]. Por último, existe una variante en la cual un actuador lineal desplaza verticalmente al sustrato flexible respecto a un soporte exterior fijo [8, 15, 16], sin embargo no se comercializa sino que se ha empleado en trabajos de investigación.

Todos estos dispositivos permiten aplicar deformación constante o variable, con diferentes formas de onda, una frecuencia menor a 2 Hz y una amplitud de hasta 20 %, con la posibilidad de observar el cultivo en un microscopio. Para ello, se utilizan sistemas complejos (varios componentes y accesorios adicionales), que requieren una PC (con software propietario) y una fuente externa de vacío (-100 kPa con flujo de 161 l/min) o dos motores, resultando en un gran peso (10 kg) y tamaño (espacio de mesada mayor a 70x40cm²) [12]. Esto limita su uso en una estufa de cultivo o campana de flujo laminar. Además, su precio supera los US\$ 30.000.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un dispositivo que permita aplicar una tensión mecánica variable (con diferentes formas de onda, frecuencia y amplitud) a un sustrato flexible y biocompatible para el cultivo celular, logrando una reducción significativa en el tamaño, peso y costo respecto a las

versiones comerciales mencionadas.

Se propone deformar una membrana a partir de la generación de vacío, similarmente a Flexcell Culture Systems® (Fig. 1), de acuerdo con los valores deseados por el usuario, sin necesidad de una PC. Para esto, se debe implementar un sistema embebido con un control a lazo cerrado que actúe sobre una válvula proporcional. Además, es necesario producir una membrana con un módulo elástico similar a la matriz extracelular de tejidos humanos. Las características de la membrana y su soporte mecánico deben permitir alcanzar una deformación similar a los dispositivos comerciales mencionados, utilizando una bomba de vacío miniatura, prescindiendo de una fuente externa de vacío de alto flujo y consumo.

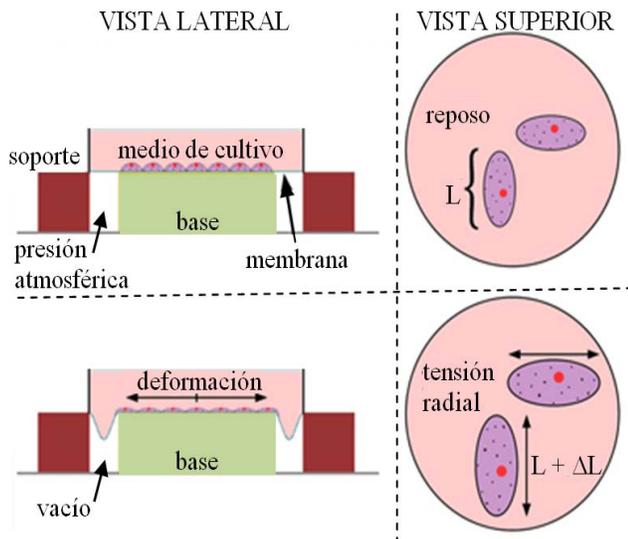


Fig. 1. Método utilizado para aplicar una tensión variable a células cultivadas sobre un sustrato flexible, propuesto por Flexcell Culture Systems® e implementado en el dispositivo desarrollado en este trabajo. A la izquierda se muestra el esquema de una cámara cuyo lado superior es una membrana flexible, sobre la cual se siembran células con medio de cultivo; arriba, la cámara con presión atmosférica; abajo, la cámara con vacío para deformar la membrana; a la derecha, el detalle de la deformación de las células.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Componentes del Dispositivo

La Fig. 2 (a) muestra el diagrama en bloques del dispositivo desarrollado cuyos componentes son:

- una cámara hermética, formada por un soporte cilíndrico con una tapa superior en forma de anillo, que sujeta una membrana flexible apta para cultivo celular.
- una pantalla y un teclado, como interfaz para que el usuario consigne la forma de onda, su frecuencia y amplitud de la deformación de la membrana;
- un actuador que genera presión negativa en la cámara, y está compuesto por una válvula proporcional, una bomba de vacío miniatura y un sensor de presión;
- un sistema embebido en un microcontrolador Atmega2560, que implementa un control cuyo objetivo es generar una señal de presión en la cámara de acuerdo con la deformación consignada por el usuario.

El costo de los componentes no supera los US\$ 160.

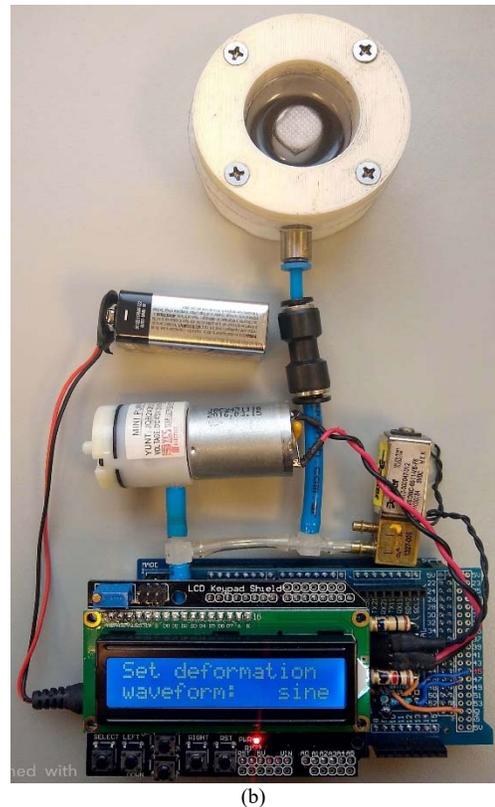
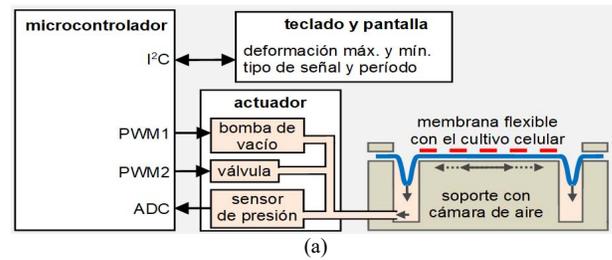


Fig. 2. Diagrama en bloques (a) del dispositivo desarrollado (b). Para deformar la membrana flexible donde se sembrarán las células, se genera una presión negativa dentro de la cámara utilizando una bomba de vacío miniatura y una válvula proporcional.

B. La Membrana y el Soporte Mecánico

La membrana, de 1 mm de espesor, fue producida utilizando polidimetilsiloxano (PDMS), por su transparencia, baja autofluorescencia, mínima citotoxicidad y su flexibilidad [7] [9].

Se determinó el módulo elástico de la membrana y el rango de comportamiento mecánico lineal realizando un ensayo de tracción en un analizador mecánico dinámico (DMA Q800, TA Instruments); las mediciones de tensión vs deformación se repitieron para dos membranas.

El soporte (Fig.) de la membrana fue fabricado utilizando el material polioximetileno (Delrin®) debido a su alta rigidez, bajo costo y alto punto de fusión (175° C), de forma que pudiera ser esterilizado por calor.

Para determinar la deformación de la membrana, sobre uno de sus lados se grabó una cuadrícula con cuadrados de 0.5 mm de lado. Se desarrolló un programa que compara imágenes de esta cuadrícula obtenidas antes y después de generar vacío y

cuantifica el porcentaje de deformación a partir del seguimiento de puntos representativos, Fig. .

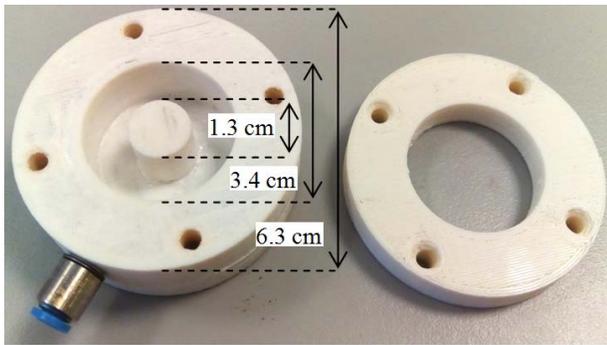


Fig. 3. Soporte mecánico utilizado para sujetar la membrana flexible y lograr una cámara hermética que permita regular el vacío en su interior para estirar la membrana.

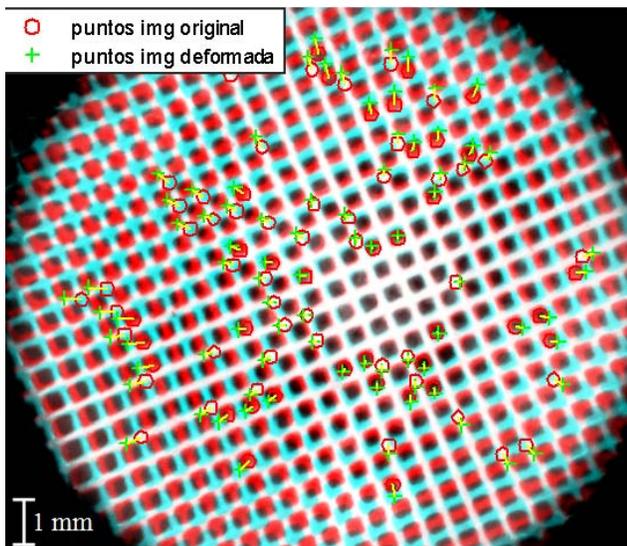


Fig. 4. Determinación de la deformación de la membrana a partir del procesamiento de imágenes de la cuadrícula grabada sobre ella. Se muestra la superposición de dos imágenes obtenidas antes y después de generar una presión en la cámara de 6 kPa por debajo de la presión atmosférica. A partir del seguimiento de los puntos representativos indicados, se determinó una deformación de 4.5 %.

Con el objetivo de relacionar la deformación (variable deseada) con la presión en la cámara (variable medida y controlada), se midió la deformación a distintos valores de presión, desde 0 a -30 kPa relativa a la presión atmosférica, y se realizó un ajuste lineal.

C. El Actuador

Los componentes del actuador implementado son:

- un sensor de presión absoluta de 5 a 115 kPa, con salida analógica amplificada entre 0 y 5 V;
- una bomba de vacío miniatura (compuesta por un motor de corriente continua y un diafragma) controlada con tensión y corriente máximas de 6 V y 450 mA, respectivamente, correspondiente a -46 kPa y 2 lpm;
- una válvula proporcional normal cerrada (con un flujo de 3 lpm para 20 kPa), controlada con tensión y corriente máximas de 8 V y 220 mA, respectivamente, utilizando el circuito de la Fig. 3.

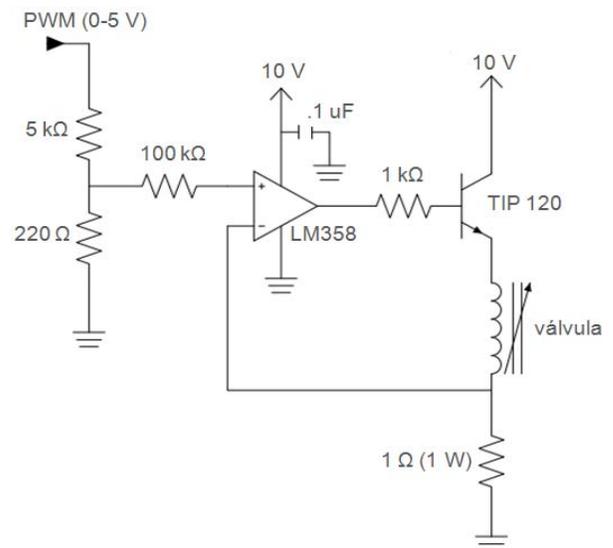


Fig. 3. Convertor de la señal de voltaje PWM del microcontrolador a corriente para controlar la válvula proporcional.

En la Fig. 4 se muestra el comportamiento estático no lineal y con histéresis tanto para la válvula como para el compresor. Esta respuesta debe ser linealizada por el control a lazo cerrado implementado.

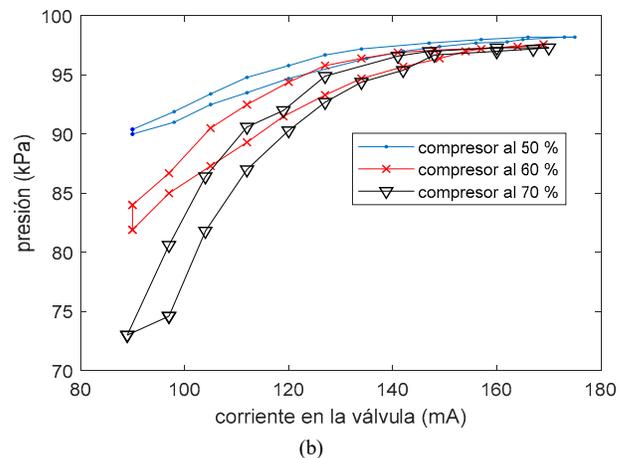
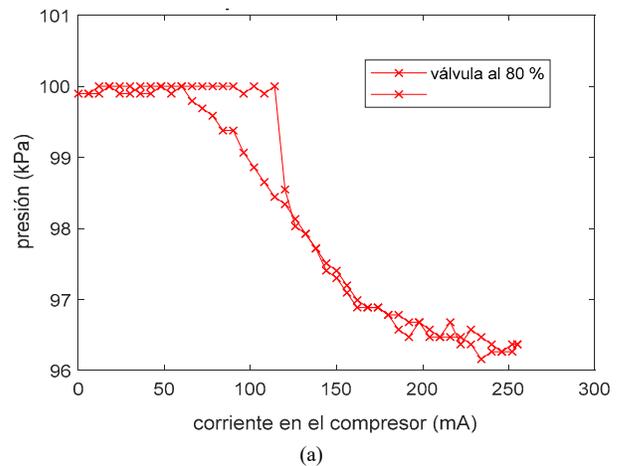


Fig. 4. Presión absoluta medida dentro de la cámara vs corriente en el compresor (a) y la válvula (b). En ambos casos se graficó el comportamiento estático al aumentar y disminuir la corriente. El comportamiento no lineal con histéresis debe ser linealizado con un control a lazo cerrado.

D. Sistema Embebido

El sistema embebido en el microcontrolador realiza las siguientes tareas en un tiempo de ejecución de 20 ms. En primer lugar, se calcula la señal de presión deseada dentro de la cámara a partir de los parámetros ingresados por el usuario (deformación máxima, mínima, tipo de señal y periodo) a través del teclado. Estos parámetros pueden ser modificados en cualquier momento, incluso mientras se aplica una deformación en la membrana. La presión deseada se resta a la presión medida dentro de la cámara (digitalizada con 10 bits de precisión) para generar una señal de error. Este error ingresa a un control a lazo cerrado cuya salida es una señal PWM ("pulse width modulation") que se aplica a la válvula proporcional, luego de ser convertida a corriente por el circuito de la Fig. 3. Una segunda salida PWM actúa sobre la bomba de vacío miniatura, cuya velocidad de respuesta es lenta en comparación con la válvula. En consecuencia, se implementó un "control de rango medio" [17], que consiste en ajustar la corriente del compresor para que el control en la válvula se mantenga dentro de su rango de regulación, sin saturar. Opcionalmente, una PC permite visualizar, almacenar y procesar las señales de presión medida y deseada y las corrientes aplicadas sobre la válvula y el compresor, mediante una interfaz gráfica de usuario desarrollada en Matlab.

E. Diseño del Control

La señal PWM sobre la válvula se calcula como la señal de control u que resulta del control C a lazo cerrado, Fig. 5. Se eligió un control con estructura proporcional-integral-diferencial (PID) paralela cuya ecuación es:

$$C(s) = Kp \cdot (b \cdot r - y) + \frac{Ki}{s} (r - y) + \frac{Kd}{Tf + 1/s} (c \cdot r - y) \quad (1)$$

donde s es la variable del dominio de la transformada de Laplace; Kp , Ki y Kd son las ganancias proporcional, integral y derivativa respectivamente; r es la señal de referencia (presión deseada); y es la señal medida (presión en la cámara), que permite definir al error $e = r - y$; b y c son los coeficientes de pesado de la señal de referencia de los términos proporcional y derivativo respectivamente; Tf es el tiempo característico asociado a un filtro de primer orden en el término derivativo.

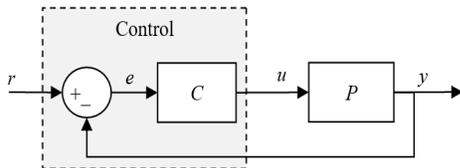


Fig. 5. Diagrama de bloques del control con realimentación implementado. La señal de control u (señal PWM sobre la válvula) es la entrada a la planta P (dinámica del actuador), cuya salida es y (presión en la cámara); la señal de referencia r (presión deseada) permite definir la señal de error $e = r - y$, que alimenta al control C .

El control C fue diseñado utilizando la función de transferencia de lazo, definida como $L = C \cdot P$, [17]. Entonces, para calcular los parámetros del control C , se especificaron L y

P de la siguiente manera. En primer lugar se definió L a partir de su frecuencia de cruce de ganancia f_{gc} y el margen de fase Pm . Se eligió $f_{gc} = 4$ Hz (indicador de la velocidad de respuesta) y $Pm = 60^\circ$ (indicador de la estabilidad).

En segundo lugar, se identificó la dinámica de la planta P (correspondiente al actuador), cuya entrada es la señal de control u (señal PWM sobre la válvula) y la salida es y (presión medida en la cámara). Para esto, se aplicó un tren de 9 pulsos cuadrados de 160 mA de amplitud y 1.2 s de duración sobre la válvula para excitar al actuador, mientras se aumentó la corriente sobre el compresor para variar la presión de trabajo. Se utilizó el método de error de predicción [18] para ajustar la entrada y la salida del actuador a un modelo lineal. Como la función de transferencia del modelo es desconocida, se repitió el ajuste utilizando distintos modelos lineales, variando la cantidad de parámetros (1 a 3 polos, 0 a 1 cero, con y sin retraso).

Por último, se verificó el funcionamiento del control implementado para diferentes tipos de señales de presión: constantes, escalones, rampas y senoidales, con una frecuencia y amplitud desde 0 hasta 2 Hz y 20 %, respectivamente. Se calculó el error (diferencia entre señal medida y deseada) cuadrático medio relativo al valor medido.

III. RESULTADOS

A. Caracterización de la Membrana

El ensayo de tracción de la membrana, Fig. 6, mostró un comportamiento lineal hasta una deformación del 20 % ($r^2 > 0.99$) y un módulo elástico medio de 260 ± 10 kPa. Este valor se encuentra en el rango del tejido biológico blando [19].

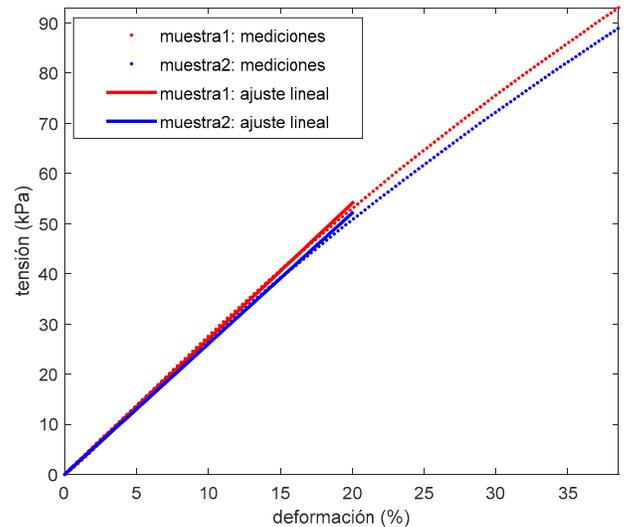


Fig. 6. Relación tensión-deformación para dos muestras de membranas ensayadas con un analizador mecánico dinámico. Se obtuvo un módulo elástico similar al tejido biológico blando y se verificó su linealidad en el rango de trabajo.

El programa desarrollado permitió determinar el porcentaje de deformación comparando dos imágenes superpuestas de la cuadrícula grabada sobre la membrana, obtenidas a diferentes valores presión en la cámara, tal como se ilustra en la Fig. .

En la Fig. 7 se graficó la deformación de la membrana (determinada a partir del procesamiento de la cuadrícula) vs la

presión en la cámara (relativa al ambiente) y se obtuvo un buen ajuste lineal, con $r > 0.99$. La pendiente de 0.59 %/kPa fue utilizada para convertir la variable definida por el usuario (deformación) en la variable controlable (presión medida).

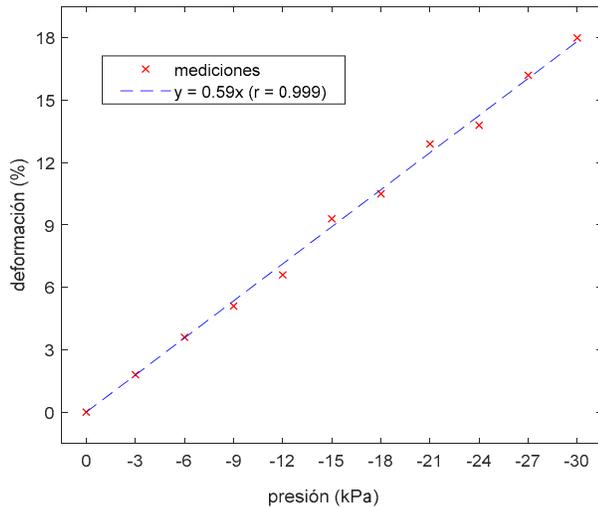


Fig. 7. Correlación lineal entre la deformación de la membrana y la presión en la cámara relativa al ambiente. La pendiente fue utilizada para convertir la variable definida por el usuario (deformación) en la variable controlable (presión).

Las dimensiones del soporte, el espesor de la membrana y su módulo elástico permitieron alcanzar una deformación del 20 % para una presión en la cámara de 32 kPa por debajo de la presión atmosférica, fácilmente alcanzable por la bomba de vacío miniatura utilizada.

B. Dinámica del Sistema y Respuesta del Control

El modelo que mejor ajustó a la dinámica del actuador al excitar la válvula con un tren de pulsos, fue un sistema subamortiguado de segundo orden con retraso y un cero (5 parámetros), **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, de acuerdo a los criterios de Akaike y bayesiano [20]. Sin embargo, se optó por un modelo subamortiguado sin retraso ni cero (3 parámetros), que ofrece suficiente ajuste y simpleza, cuya función de transferencia $P(s)$ es:

$$P(s) = \frac{y(s)}{u(s)} = \frac{K}{1 + 2 \cdot Z \cdot Tw \cdot s + (Tw \cdot s)^2} \quad (2)$$

donde s es la variable del dominio de la transformada de Laplace, y es la señal de presión en la cámara, u es la señal PWM sobre la válvula, K es la ganancia proporcional del sistema, Z el factor de amortiguamiento y Tw la constante de tiempo del par de polos complejos conjugados. Los valores obtenidos para estos parámetros varían de acuerdo con la presión de trabajo (Tabla I), determinada por la deformación deseada por el usuario y la relación presión-deformación de la membrana. Para evitar esta no linealidad del sistema, se utilizó el valor medio de los parámetros del modelo para diseñar el control con el método mencionado.

TABLA I
PARÁMETROS DEL MODELO DE LA DINÁMICA DEL ACTUADOR

Parámetro	Valor				
	medio	desvío estándar	mín.	máx.	
Kp (kPa/mA)	ganancia proporcional	89	29	55	133
Tw (ms)	constante de tiempo del par de polos complejos conjugados	70	47	23	123
Z (adim.)	factor de amortiguamiento	542	187	236	769

Los valores obtenidos para los parámetros del modelo subamortiguado elegido, varían de acuerdo con la presión de trabajo, determinada por la deformación deseada por el usuario y la relación presión-deformación de la membrana.

El control implementado linealizó la respuesta del actuador y permitió generar señales de presión constantes, cuadradas, triangulares o senoidales, Fig. 9, seleccionables por el usuario, con un error cuadrático medio relativo menor al 5 %.

IV. DISCUSIÓN

En este trabajo se detalla el desarrollo de un dispositivo que permite generar una deformación variable en un sustrato flexible y biocompatible, apto para el cultivo celular.

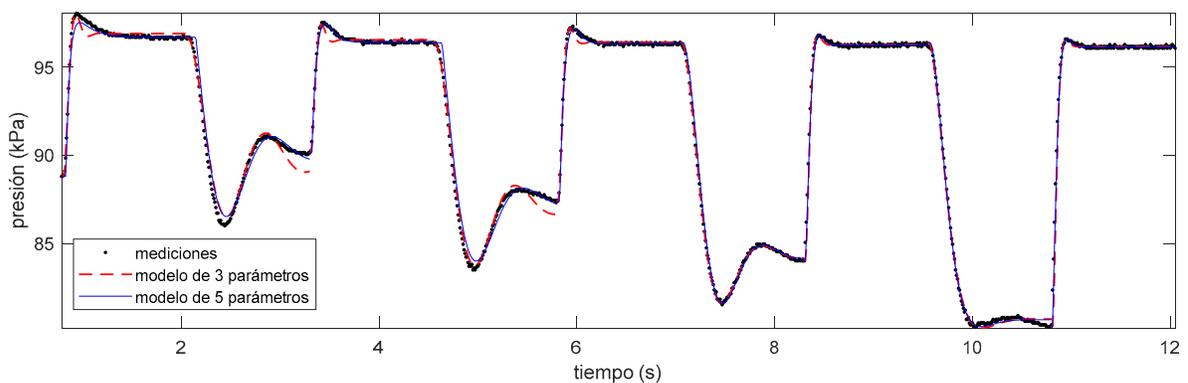


Fig. 8. Señal de presión absoluta medida (puntos negros) dentro de la cámara, utilizada para la identificación de la dinámica del actuador. Esta respuesta se obtuvo al aplicar pulsos cuadrados sobre la válvula para excitar al actuador, mientras se aumentó la corriente sobre el compresor para variar la presión de trabajo. El modelo que mejor ajustó fue un sistema subamortiguado de segundo orden con retraso y un cero (5 parámetros, línea continua azul). Sin embargo, para diseñar el control se optó por un modelo subamortiguado sin retraso ni cero (3 parámetros, línea discontinua roja), que ofrece suficiente ajuste y simpleza.

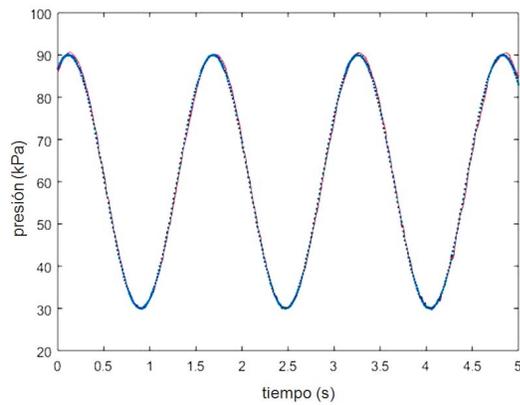


Fig. 9. Señales medida (puntos negros) y deseada (línea azul) de presión absoluta en la cámara en función del tiempo. El control a lazo cerrado compensó el comportamiento no lineal de la válvula y el compresor y permitió generar señales constantes, escalones, rampas y senoidales con una velocidad y amplitud similares a los dispositivos comerciales.

En primer lugar, se decidió implementar el método propuesto por Flexcell® (generación de vacío) para aplicar una deformación al sustrato debido a que es el dispositivo más utilizado para esta aplicación de acuerdo a la cantidad de publicaciones.

En nuestro caso, los componentes electrónicos utilizados son de bajo costo y disponibles localmente mientras que el soporte de la cámara y la membrana fueron de diseño y manufactura propios. De hecho, las dimensiones del soporte, el espesor de la membrana y su módulo elástico permitieron alcanzar una deformación del 20 % utilizando una bomba de vacío miniatura, lo que permite prescindir de una fuente externa de vacío de alto flujo y consumo. Tampoco es necesario una PC, ya que el sistema embebido desarrollado es autónomo. Se logró entonces un sistema que, comparado con una versión comercial similar [12], tiene menor tamaño (más de 70x40 cm² vs 9x15 cm²), peso total (10 kg vs 0.4 kg), cantidad de componentes (22 vs 3) y costo (más de US\$ 50.000 vs US\$ 160). Esta menor complejidad facilita el uso del dispositivo en una estufa de cultivo o campana de flujo laminar.

Respecto a la membrana flexible producida, se obtuvo un sustrato con un módulo elástico similar a la matriz extracelular del tejido biológico blando [19], de acuerdo al ensayo de tracción, Fig. 6. Además, la relación lineal que se observa en la Fig. 7 entre la presión en la cámara y la deformación (cuantificada con nuestro programa a partir de la cuadrícula grabada sobre la membrana, Fig.) permitió convertir la variable definida por el usuario (deformación) en la variable controlable (presión). La biocompatibilidad de la membrana se determinó conforme a la norma ISO10993-5 (viabilidad de cultivo de fibroblastos) en un trabajo previo aún no publicado.

Por otro lado, la identificación de la dinámica del actuador (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, modelo subamortiguado de segundo orden, ec. 2, cuyos parámetros varían de acuerdo al punto de trabajo, Tabla I), permitió diseñar un control PID que actúa sobre la válvula. El control fue diseñado especificando la frecuencia de cruce de ganancia f_{gc} (indicador de la velocidad de respuesta) y el margen de

fase P_m (indicador de la estabilidad) de la función de transferencia de lazo L [17]. El control implementado compensó el comportamiento no lineal de la válvula y el compresor, Fig. 4, y permitió generar señales de presión, Fig. 9, con amplitud y velocidad en el mismo rango que los dispositivos comerciales similares [9-12].

El dispositivo similar comercializado por Flexcell® calcula la deformación de la membrana a partir de tablas que relacionan este valor con la presión dentro de la cámara. Determinaron esta relación a partir del procesamiento de imágenes de marcas sobre la membrana, que resultó no lineal [21], sin embargo no se informó ningún análisis estadístico. Incluso un grupo de investigadores reportó diferencias entre la deformación informada por el dispositivo y el valor medido por ellos [22]. En nuestro caso, utilizamos el mismo método para determinar la deformación e incluso obtuvimos una relación lineal tanto en el ensayo mecánico como en la relación presión-deformación. En este trabajo no solo se presenta mayor información respecto al funcionamiento del dispositivo, sino que también resulta alentadora para avanzar con una versión comercial que permita reemplazar al dispositivo ofrecido por Flexcell®.

Se deben reconocer ciertas limitaciones. Por un lado, resta evaluar la reproducibilidad del proceso de producción de membranas. Por otro lado, es necesario incluir códigos de error en caso de no lograr la deformación elegida.

Como trabajo futuro, se utilizará el dispositivo desarrollado para el crecimiento de cultivos celulares sometidos a ciclos de deformación de la membrana y se compararán los resultados con la bibliografía. Una potencial aplicación es el cultivo de bioimpresiones 3D sobre este sustrato con tensión mecánica variable. Posteriormente, se analizará la patentabilidad y viabilidad comercial del desarrollo.

Como conclusión, se desarrolló un dispositivo para el cultivo celular en un sustrato flexible, cuya deformación, estática o dinámica, es seleccionable por el usuario. Su costo, tamaño y peso son considerablemente menores que las versiones comerciales.

APÉNDICE

Se encuentra disponible un video del dispositivo en funcionamiento en <https://youtu.be/XtFPMgHwrzo>.

REFERENCIAS

- [1] A. J. Banes, M. Tsuzaki, J. Yamamoto, B. Brigman, T. Fischer, T. Brown, *et al.*, "Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 73, pp. 349-365, 1995.
- [2] A. W. Orr, B. P. Helmke, B. R. Blackman, and M. A. Schwartz, "Mechanisms of mechanotransduction," *Developmental cell*, vol. 10, pp. 11-20, 2006.
- [3] D. E. Discher, P. Janmey, and Y.-I. Wang, "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate," *Science*, vol. 310, pp. 1139-1143, 2005.
- [4] D. E. Ingber, "Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again," *The FASEB journal*, vol. 20, pp. 811-827, 2006.
- [5] I. Martin, D. Wendt, and M. Heberer, "The role of bioreactors in tissue engineering," *TRENDS in Biotechnology*, vol. 22, pp. 80-86, 2004.

- [6] 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 Engineering Part B: Reviews*, vol. 18, pp. 288-300, 2012.
- [7] K. Kurata, K. Sumida, and H. Takamatsu, "Open-source cell extension system assembled from laser-cut plates," *HardwareX*, vol. 5, p. e00065, 2019.
- [8] J. L. Schaffer, M. Rizen, G. J. L'Italien, A. Benbrahim, J. Megerman, L. C. Gerstenfeld, *et al.*, "Device for the application of a dynamic biaxially uniform and isotropic strain to a flexible cell culture membrane," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 12, pp. 709-719, 1994.
- [9] K. Naruse, "MECHANOMEDICINE: applications of mechanobiology to medical sciences and next-generation medical technologies," *Journal of Smooth Muscle Research*, vol. 54, pp. 83-90, 2018.
- [10] *STREX Inc.* Available: <https://strexcell.com>
- [11] "Menicon Life Sciences <https://www.menicon-lifescience.com/english/shellpapro.html>."
- [12] *FlexCell Web Page.* Available: <https://www.flexcellint.com>
- [13] A. J. Banes, "Apparatus for applying stress to cell cultures," ed: Google Patents, 1989.
- [14] J. Garvin, J. Qi, M. Maloney, and A. J. Banes, "Novel system for engineering bioartificial tendons and application of mechanical load," *Tissue engineering*, vol. 9, pp. 967-979, 2003.
- [15] S. Wada, H. Kanzaki, T. Narimiya, and Y. Nakamura, "Novel device for application of continuous mechanical tensile strain to mammalian cells," *Biology open*, vol. 6, pp. 518-524, 2017.
- [16] C. P. Ursekar, S.-K. Teo, H. Hirata, I. Harada, K.-H. Chiam, and Y. Sawada, "Design and construction of an equibiaxial cell stretching system that is improved for biochemical analysis," *PLoS one*, vol. 9, p. e90665, 2014.
- [17] K. J. Aström and R. M. Murray, *Feedback systems: an introduction for scientists and engineers*: Princeton university press, 2010.
- [18] L. Ljung, "Identification for control: Simple process models," in *Decision and Control, 2002, Proceedings of the 41st IEEE Conference on*, 2002, pp. 4652-4657.
- [19] K. Arda, N. Ciledag, E. Aktas, B. K. Arbas, and K. Köse, "Quantitative assessment of normal soft-tissue elasticity using shear-wave ultrasound elastography," *American Journal of Roentgenology*, vol. 197, pp. 532-536, 2011.
- [20] G. Schwarz, "Estimating the dimension of a model," *The annals of statistics*, vol. 6, pp. 461-464, 1978.
- [21] "101: Loading Stations™ Quantification of Strain on the Membrane Surface."
- [22] J. P. V. Geest, E. S. Di Martino, and D. A. Vorp, "An analysis of the complete strain field within Flexercell™ membranes," *Journal of biomechanics*, vol. 37, pp. 1923-1928, 2004.