



**Universidad
Europea**

Máster en Bioinformática

Predicción de resistencias a antibióticos a partir del resistoma intestinal en pacientes con enfermedad de Crohn

Autor: Clara Barcelón Batlle

Tutor: Marianela Tibisay Ravelo Velásquez

Curso 2024-2025

RESUMEN

Objetivos: Analizar la presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en comunidades microbianas intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn, comparando sus perfiles metagenómicos con los de individuos sanos.

Material y métodos: Se emplearon 140 muestras fecales (70 Crohn y 70 controles) obtenidas de bases de datos públicas (HMP2 e HMP). Tras control de calidad, las secuencias fueron analizadas mediante Kraken2 para la caracterización taxonómica, y DeepARG para la identificación y cuantificación de ARGs. Se generaron matrices de abundancia relativas normalizadas (CPM) y se aplicaron análisis estadísticos no paramétricos (Mann–Whitney U) con corrección por FDR (Benjamini–Hochberg).

Resultados: La microbiota de pacientes con enfermedad de Crohn mostró un aumento significativo de Proteobacteria (8.5% vs. 0.7%, $q=0.0012$) y Fusobacteria (0.52% vs. 0.00%, $q=0.0004$), junto a una reducción de especies comensales como *Alistipes shahii* y *Odoribacter splanchnicus*. La riqueza y abundancia total de ARGs fueron significativamente mayores en Crohn (mediana riqueza: 165 vs. 113; $p<0.0001$). Se identificaron 159 genes diferenciales, destacando un enriquecimiento en clases como aminoglycoside: aminocoumarin, rifamycin, nucleoside, fosfomycin, nitroimidazole y triclosan ($q<0.005$, $\log_2FC>1$).

Conclusiones: La enfermedad de Crohn se asocia con un desequilibrio de la microbiota intestinal y una mayor inestabilidad en su composición. Esta disbiosis se vincula estrechamente con un resistoma expandido y más diverso, lo que refuerza la importancia de considerar tanto la dimensión taxonómica como la funcional en el estudio de la enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad de Crohn, microbiota intestinal, resistoma, genes de resistencia a antibióticos, metagenómica, DeepARG.

ABSTRACT

Objectives: To analyze the presence of antibiotic resistance genes (ARGs) in the intestinal microbial communities of patients with Crohn's disease, comparing their metagenomic profiles with those of healthy individuals.

Materials and Methods: A total of 140 fecal samples (70 Crohn's and 70 controls) were obtained from public databases (HMP2 and HMP). After quality control, sequences were analyzed using Kraken2 for taxonomic characterization, and DeepARG for the identification and quantification of ARGs. Normalized relative abundance matrices (CPM) were generated, and non-parametric statistical analyses (Mann–Whitney U) with FDR correction (Benjamini–Hochberg) were applied.

Results: The microbiota patients suffering of Crohn's disease showed a significant increase in *Proteobacteria* (8.5% vs. 0.7%, $q=0.0012$) and *Fusobacteria* (0.52% vs. 0.00%, $q=0.0004$), along with a reduction in commensal species such as *Alistipes shahii* and *Odoribacter splanchnicus*. The richness and total abundance of ARGs were significantly higher in Crohn's (median richness: 165 vs. 113; $p<0.0001$). A total of 159 differential genes were identified, highlighting enrichment in classes such as aminoglycoside:aminocoumarin, rifamycin, nucleoside, fosfomicin, nitroimidazole, and triclosan ($q<0.005$, $\log_2FC>1$).

Conclusions: Crohn's disease is associated with an imbalance in the intestinal microbiota and greater instability in its composition. This dysbiosis is closely linked to an expanded and more diverse resistome, underscoring the importance of considering both taxonomic and functional dimensions in the study of the disease.

Keywords: Crohn's disease, gut microbiota, resistome, antibiotic resistance genes, metagenomics, DeepARG.

1. Introducción

La enfermedad de Crohn (CD, por sus siglas en inglés) es una de las principales enfermedades inflamatorias intestinales (IBD, por sus siglas en inglés) que se caracteriza por una inflamación que afecta todas las capas de la pared del tracto gastrointestinal. Su origen es multifactorial e implica una compleja interacción entre predisposición genética, respuesta inmune alterada, factores ambientales y modificaciones en la microbiota intestinal (Xavier & Podolsky, 2007). A pesar de los avances terapéuticos, la incidencia y prevalencia de la CD continúan en aumento a nivel global, especialmente en países industrializados, lo que pone de manifiesto la necesidad de comprender mejor los mecanismos implicados en su fisiopatología (Hracs et al., 2025). En su desarrollo, se observan alteraciones importantes en la microbiota intestinal, con una menor diversidad de especies, lo cual compromete la integridad de la barrera intestinal y desencadena respuestas inmunes anómalas, especialmente en personas con predisposición genética (Caparrós et al., 2021).

La composición de la microbiota intestinal de un individuo sano muestra una gran diversidad y suele mantenerse bastante estable durante años, aunque puede sufrir pequeñas alteraciones temporales y reversibles. Predominan las bacterias de los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, con proporciones variables entre un 15-50% y un 20-50% respectivamente y que cumplen funciones esenciales en la digestión, la producción de metabolitos y la regulación de la inmunidad (Qin et al., 2010). En cantidades menores, también están presentes bacterias de los filos *Actinobacteria* (<5%) y *Proteobacteria* (<10%). No obstante, la variedad entre individuos incrementa considerablemente cuando se analiza a niveles taxonómicos más específicos (Yilmaz et al., 2019).

En la enfermedad de Crohn, sin embargo, numerosos estudios han descrito un patrón de disbiosis, caracterizado por una reducción de bacterias comensales beneficiosas y un incremento de bacterias oportunistas (Manichanh et al., 2006; Gevers et al., 2014). Entre los cambios más destacados se encuentra la disminución de productores de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) como *Faecalibacterium prausnitzii* y *Alistipes spp.*, junto con el aumento de miembros del filo *Proteobacteria*, particularmente cepas de *Escherichia coli* con propiedades adherentes e invasivas (Pittayanon et al., 2019).

La disbiosis no solo implica alteraciones taxonómicas, sino también cambios profundos en la funcionalidad del microbioma, como la pérdida de funciones metabólicas protectoras y la ganancia de funciones potencialmente dañinas, como la capacidad de degradar la mucosa o resistir la acción de antimicrobianos (Franzosa et al., 2019; Lloyd-Price et al., 2019). En este sentido, el análisis del metagenoma ha permitido pasar de la mera descripción de taxones a la identificación de rutas metabólicas y genes implicados en la resistencia a antibióticos.

El conjunto de genes de resistencia a antibióticos (ARGs por sus siglas en inglés) presente en un microbioma (tanto en bacterias patógenas y no patógenas) se conoce como resistoma. Estos genes, son los responsables de proporcionar resistencia a algunas bacterias, permitiéndoles sobrevivir y multiplicarse a pesar de estar expuestas a antibióticos que antes eran eficaces contra ellas (Wright, 2007). Investigaciones recientes han mostrado que el resistoma humano refleja no solo la historia de exposición a antibióticos, sino también la composición microbiana y el estado de salud del huésped (Forslund et al., 2013; Hu et al., 2013). En pacientes con IBD, se ha descrito un resistoma más amplio y diverso en comparación con individuos sanos, lo cual podría estar relacionado con la mayor frecuencia de tratamientos antibióticos, el sobrecrecimiento de bacterias oportunistas resistentes y la inflamación intestinal crónica (Zhang et al., 2024).

La expansión del resistoma en la IBD tiene importantes implicaciones clínicas. En primer lugar, limita las opciones terapéuticas al reducir la eficacia de antibióticos de uso común (Thänert et al., 2022). Asimismo, la expansión del resistoma puede estar relacionada con una mayor colonización por enterobacterias multirresistentes y un riesgo elevado de infecciones en pacientes hospitalarios (Kharaghani et al., 2023). Además, el resistoma puede actuar como un indicador indirecto de disbiosis severa, reflejando un ecosistema intestinal dominado por bacterias con alta plasticidad genómica y capacidad de adaptación frente a presiones selectivas. Esta perspectiva funcional convierte al resistoma en un candidato atractivo para el desarrollo de biomarcadores, capaces de complementar los análisis taxonómicos y aportar información más directa sobre el estado ecológico y clínico del microbioma (Fredinksen et al., 2023; Safarchi et al., 2025).

En los últimos años, se han desarrollado diversas aproximaciones para identificar genes de resistencia diferenciales en cohortes de pacientes. El análisis de metagenomas completos con herramientas como CARD o MEGARes ha permitido catalogar decenas

de miles de genes de resistencia y compararlos entre grupos de interés (Alcock et al., 2023; Doster et al., 2020). El estudio del resistoma permite seleccionar genes que se encuentran diferencialmente representados en enfermedades como Crohn, y plantear su uso como biomarcadores funcionales. Estos genes pueden pertenecer a mecanismos diversos: bombas de eflujo multidroga, modificación de blancos antibióticos, degradación enzimática o reducción de permeabilidad de membrana (Alcock et al., 2023). Su validación en cohortes independientes y con metodologías complementarias, como el estudio de la metatranscriptómica y metaproteómica es un paso clave para trasladar su hallazgo al ámbito clínico (Franzosa et al., 2014; Zhang et al., 2018; Wang et al., 2020).

Además, la incorporación de modelos de machine learning y deep learning ha abierto nuevas posibilidades para el análisis del resistoma. Ejemplos incluyen Deeparg, que permite identificar genes de resistencia a antibióticos directamente a partir de lecturas cortas (Arango-Argoty et al., 2018) y que ha sido utilizada en el presente trabajo; PRAP: *Pan Resistome Analysis Pipeline*, que combina análisis de resistomas con clasificadores *random forest* (He et al., 2020); o *Dramma* capaz de identificar genes de resistencia sin similitud de secuencia a partir de propiedades estructurales y genómicas (Rannon et al., 2025). Estos enfoques no solo facilitan la selección de biomarcadores, sino que también permiten construir modelos diagnósticos y pronósticos de gran utilidad clínica.

En este trabajo se aborda de manera integrada el análisis de la microbiota intestinal y del resistoma en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos mediante enfoques metagenómicos. Se estudia la composición taxonómica a distintos niveles, la diversidad microbiana y la carga de genes de resistencia a antibióticos, con el objetivo de identificar diferencias relevantes entre ambos grupos. Asimismo, se evalúa la abundancia diferencial de genes específicos de resistencia y se propone un conjunto de candidatos con potencial valor como biomarcadores funcionales. Este enfoque combinado busca aportar una visión más completa de la interacción entre disbiosis, resistencia antimicrobiana y fisiopatología de la enfermedad de Crohn.

2. Hipótesis y Objetivos

Las comunidades microbianas intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn presentan perfiles taxonómicos y de resistencia a antibióticos significativamente diferentes respecto a individuos sanos, lo que podría reflejar una mayor inestabilidad microbiana.

Objetivo general: Analizar la presencia de genes resistentes a antibióticos en comunidades microbianas intestinales de pacientes con enfermedades de Crohn en comparación con individuos sanos.

Objetivos específicos:

- Obtener y procesar datos metagenómicos intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn y de individuos sanos a partir de bases de datos públicas.
- Caracterizar la composición taxonómica de las comunidades microbianas intestinales en pacientes con enfermedad de Crohn y de control de pacientes sanos.
- Identificar y cuantificar genes de resistencia a antibióticos (ARGs) mediante herramientas bioinformáticas.

Comparar estadísticamente las diferencias taxonómicas y funcionales entre los grupos (Control vs pacientes con enfermedad de Crohn).

3. Metodología

3.1. Obtención de datos

En esta investigación se emplearon datos metagenómicos procedentes del proyecto *Inflammatory Bowel Disease Multi'omics Database* (IBDMD) del HMP2 Lloyd-Price et al. (2019).

Las secuencias fueron descargadas desde el repositorio NCBI SRA (BioProject: PRJNA398089). De este conjunto se seleccionaron 70 muestras fecales al azar de individuos diagnosticados con enfermedad de Crohn.

Dado que las muestras de sujetos sanos en el proyecto IBDMD correspondían a biopsias rectales, y con el objetivo de homogenizar los tipos de muestra, las secuencias correspondientes a individuos sanos control fueron obtenidas de muestras fecales del *Human Microbiome Project* (Peterson et al., 2009; BioProject: PRJNA48479).

Todas las muestras (control y Crohn) se obtuvieron a partir de Illumina HiSeq2000. En ambos grupos se seleccionaron 70 muestras de adultos, equilibradas por sexo (35 mujeres y 35 hombres). Se creó un archivo con los metadatos de cada muestra, incluyendo el identificador SRR, el sexo del individuo y la condición (control o Crohn) (anexo 8.1.).

3.2. Análisis taxonómico

Para la caracterización taxonómica de las comunidades microbianas presentes se empleó el software Kraken2, una herramienta de clasificación taxonómica basada en k-mers que asigna lecturas a taxones de referencia mediante coincidencias exactas (Wood et al., 2019). Las lecturas previamente filtradas y combinadas de cada muestra fueron procesadas mediante un *pipeline* automatizado desarrollado en Python, que invocaba a Kraken2 con la base de datos *MiniKraken2* (National Center for Biotechnology Information, NCBI).

Posteriormente, los reportes generados fueron integrados en matrices de abundancia relativa a nivel de filo y especie, para analizar las abundancias relativas bacterianas presentes en las muestras. Se reportaron la diversidad alfa, calculada con el índice de Shannon, comparando los grupos Crohn y control mediante la prueba de Mann-Whitney y la diversidad beta, calculada con las distancias de Bray-Curtis entre muestras y se

representaron mediante análisis de coordenadas principales (PCoA). También se identificaron los taxones diferenciales entre los dos grupos mediante la prueba de Mann-Whitney. A los p valores obtenidos se les aplicó la corrección de Benjamini–Hochberg (FDR) y se obtuvieron q valores. Se estableció $q < 0.05$ como umbral significativo.

3.3. Análisis de ARGs

Para el análisis bioinformático, primero se descargaron los datos metagenómicos en formato FASTQ asociados a los identificadores SRR y se usó *fasterq-dump* para convertir los archivos a formato *paired-end*. A continuación, con *fastp*, se eliminaron los adaptadores, se recortaron bases de baja calidad y se generaron reportes de control de calidad para cada muestra.

Posteriormente, las lecturas limpias fueron analizadas con DeepARG (Arango-Argoty et al., 2018). Se empleó el modo *predict* con el modelo SS (*short sequences*), trabajando con archivos combinados de lecturas forward y reverse, y se estableció un umbral de probabilidad mínimo de 0.8 para incrementar la precisión. Los resultados de cada muestra se almacenaron como archivos *mapping.ARG*, que contienen tanto identificaciones de ARGs individuales como su asignación a clases antibióticas.

Posteriormente, se generaron dos matrices de abundancia: una a nivel de genes (ARG) y otra a nivel de clases de antibióticos. Estas matrices contabilizan el número de veces que cada gen o clase fue detectado por muestra. Antes del análisis estas matrices se normalizaron a conteos por millón (CPM, por sus siglas en inglés) y se les aplicó la transformación logarítmica para suavizar la distribución y facilitar los análisis comparativos y visualizaciones.

Todos los scripts utilizados en este trabajo se pueden encontrar en GitHub: https://github.com/clarabarcelon22-cloud/22433914_tfm_clarabarcelonbatlle

3.4. Análisis estadístico

Se emplearon mediana e IQR para resumir la diversidad y abundancia de ARGs en cada muestra, siguiendo enfoques adoptados en resistomas con distribuciones altamente asimétricas (Araos et al., 2019).

Para la comparación de grupos se usó el Mann-Whitney test, y se aplicó la corrección por múltiples pruebas de Benjamini–Hochberg con el fin de controlar la tasa de falsos positivos (FDR). Un q-valor < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

4. Resultados

4.1. Análisis taxonómico

En el análisis de la composición taxonómica a nivel de filo taxonómico se observa que tanto en pacientes con enfermedad de Crohn como en los controles sanos predominan *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, que en conjunto representan más del 85% de la comunidad bacteriana. Sin embargo, en Crohn la proporción de *Bacteroidetes* es menor (63.6% vs. 74.9%) mientras que *Firmicutes* es ligeramente mayor (24.8% vs. 20.9%), aunque las diferencias no son significativas. Destaca un incremento notable en *Proteobacteria* en Crohn (8.5% vs. 0.7%, $q=0.0012$), así como un aumento de los filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Chordata* (estos dos últimos prácticamente inexistentes en los individuos control). Los filos *Verrucomicrobia* y *Euryarchaeota* fueron significativamente mayores en los individuos control, aunque su abundancia relativa fue baja (Tabla 1, Figura 1).

Taxon	ARM Crohn (%)	ARM Control (%)	log2FC	p-valor	q-valor
<i>Bacteroidetes</i>	63.59	74.92	-0.25	0.0355	0.0609
<i>Firmicutes</i>	24.75	20.91	0.24	0.2596	0.3891
<i>Proteobacteria</i>	8.50	0.67	3.67	0.0004	0.0012
<i>Actinobacteria</i>	1.94	1.24	0.65	0.0008	0.0019
<i>Fusobacteria</i>	0.52	0.00	8.66	0.0001	0.0004
<i>Chordata</i>	0.35	0.11	1.65	0.0000	0.0001
<i>Verrucomicrobia</i>	0.30	1.08	-1.84	0.0000	0.0000
<i>Synergistetes</i>	0.03	0.02	0.74	0.9851	0.9851
<i>Lentisphaerae</i>	0.01	1.04	-6.39	0.8942	0.9754
<i>Euryarchaeota</i>	0.00	0.02	-17.43	0.0020	0.0041

Tabla 1. Abundancia relativa media (ARM) (%) de los principales filos taxonómicos en muestras de pacientes con enfermedad de Crohn frente a controles sanos. Los valores se expresan como porcentajes de abundancia relativa. Se incluyen además log2FC, valores p y valores q tras corrección por FDR. En negrita se encuentran representados los filos con diferencia significativa.

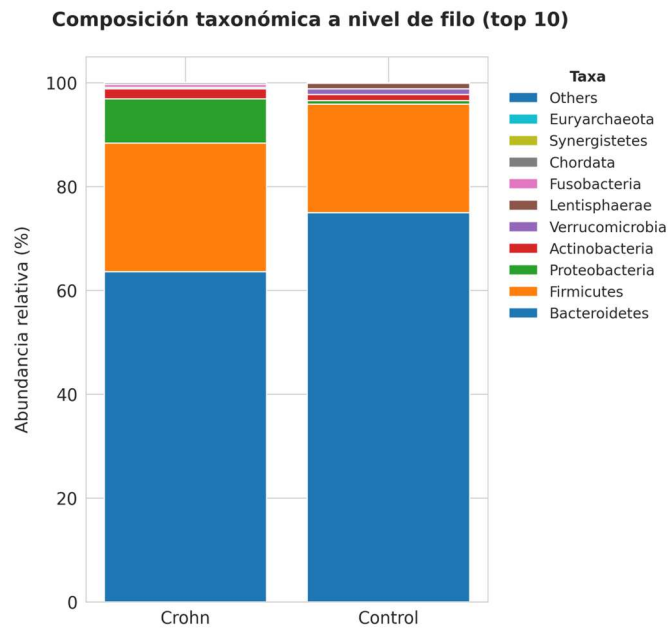


Figura 1. Composición taxonómica relativa a nivel de filo (top 10) en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.

Una vez hecho el análisis a nivel de filo taxonómico se prosiguió con estudiar la composición metagenómica a nivel de especie. De las 4144 especies reportadas en la base de datos Minikraken2, 232 fueron detectadas en las muestras y de estas 55 fueron significativamente diferentes ($q < 0.05$) entre los grupos de pacientes Control y pacientes con enfermedad de Crohn.

El análisis a nivel de especie muestra que tanto en pacientes con enfermedad de Crohn como en los controles sanos la microbiota intestinal está dominada por especies del género *Bacteroides*, destacando *Bacteroides vulgatus*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron* y *B. fragilis*. También son abundantes especies como *Faecalibacterium prausnitzii*, y otros miembros de los géneros *Alistipes* y *Ruminococcus* (Figura 2).

De los 20 taxones más prevalentes, 9 fueron significativamente diferentes entre los grupos control y Crohn (Tabla 2). Algunas especies aparecen enriquecidas en los pacientes con la enfermedad Crohn, entre ellas *Clostridium boltea* (2.71% vs. 0.17%), *Escherichia coli* (3.99% vs. 0.04%) y *Veillonella parvula* (2.79% vs. 0.04%). Por el contrario, varias especies aparecen en menor cantidad en la enfermedad de Crohn, destacando *Alistipes shahii* (0.62% vs. 5.17%), *Alistipes finegoldii* (0.93% vs. 4.42%) y el bacteriófago *uncultured crAssphage* (0.29% vs. 2.52%). También especies comensales como *Odoribacter splanchnicus* y *Bacteroides caecimuris* muestran reducciones significativas en la enfermedad de Crohn.

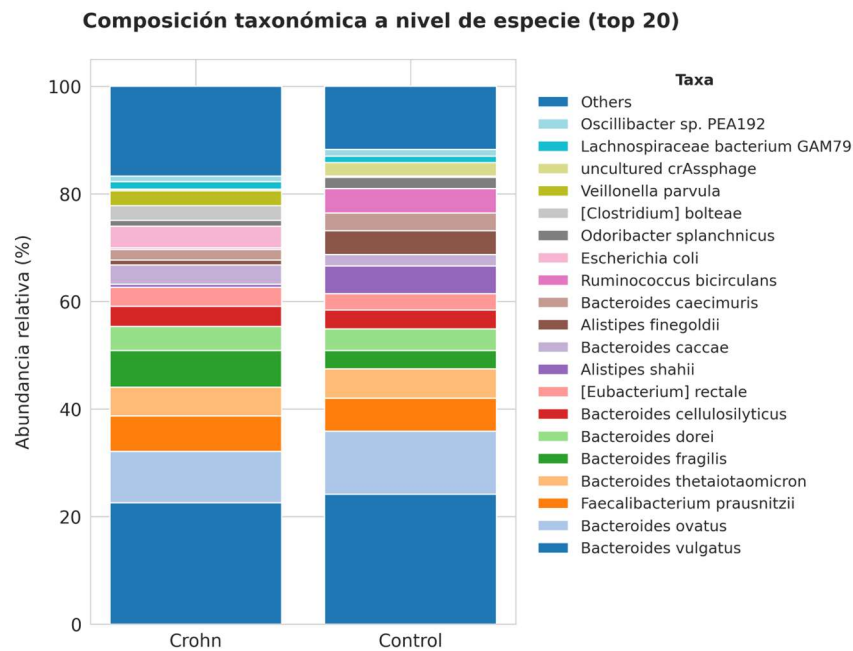


Figura 2. Composición taxonómica relativa a nivel de filo taxonómico (top 10) en pacientes con enfermedad de Crohn y controles sanos.

Taxon	ARM Crohn (%)	ARM Control (%)	log2FC	p-valor	q-valor
<i>Alistipes shahii</i>	0.62	5.17	-3.05	<0.0001	<0.0001
<i>Clostridium bolteae</i>	2.71	0.17	4.03	<0.0001	<0.0001
<i>Escherichia coli</i>	3.99	0.04	6.64	<0.0001	<0.0001
<i>uncultured crAssphage</i>	0.29	2.52	-3.13	<0.0001	<0.0001
<i>Alistipes finegoldii</i>	0.93	4.42	-2.25	<0.0001	<0.0001
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	1.10	2.11	-0.94	0.0001	0.0008
<i>Bacteroides caecimuris</i>	1.99	3.33	-0.74	0.0006	0.0048
<i>Veillonella parvula</i>	2.79	0.04	6.25	0.0022	0.0138
<i>Lachnospiraceae bacterium</i> <i>GAM79</i>	1.40	1.17	0.26	0.0077	0.0343

Tabla 2. Abundancia relativa media (ARM) (%) de las principales especies bacterianas en muestras de pacientes con enfermedad de Crohn frente a controles sanos. Los valores se expresan como porcentajes de abundancia relativa. Se incluyen además log2FC, valores p y valores q tras corrección por FDR.

Una vez analizada la composición a nivel de especie se prosiguió con un estudio de la diversidad. La diversidad alfa, evaluada mediante el índice de Shannon y mide la riqueza de especies. Este índice de Shannon no mostró diferencias significativas entre pacientes con enfermedad de Crohn y controles, tanto a nivel de filo taxonómico ($U = 2700.0$, $p = 0.298$) como a nivel de especie ($U = 2222.0$, $p = 0.343$). Aunque las medianas fueron comparables entre grupos (Crohn: 2.28 [IQR 1.94–2.49] vs. Controles: 2.25 [IQR 2.10–2.56]), se observó una mayor dispersión de los valores en pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con los controles, lo que sugiere una mayor heterogeneidad interindividual en la microbiota de estos pacientes (Figura 3).

En cuanto a la diversidad beta, analizada mediante análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia de Bray–Curtis y que explica las diferencias en la composición entre muestras, no se aprecia una separación clara entre los pacientes con la enfermedad de Crohn y controles sanos, ni a nivel de filo taxonómico ni de especie. Aun así, se puede observar que los controles muestran comunidades microbianas más homogéneas entre sí, mientras que los pacientes con enfermedad de Crohn presentan una mayor dispersión, lo que refleja una mayor heterogeneidad interindividual. Este patrón concuerda con el observado con el índice de Shannon y sugiere que la enfermedad de Crohn está asociada a una microbiota más variable y menos estable (Figura 4).

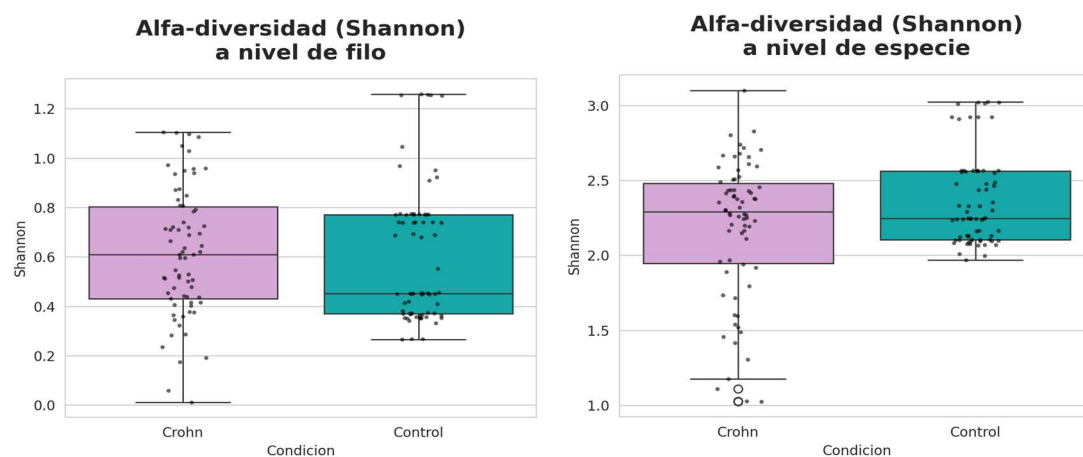


Figura 3. Representación gráfica de la diversidad alfa (índice de Shannon) en las muestras de pacientes con enfermedad de Crohn (color violeta) y Control de pacientes sanos (color azul turquesa).

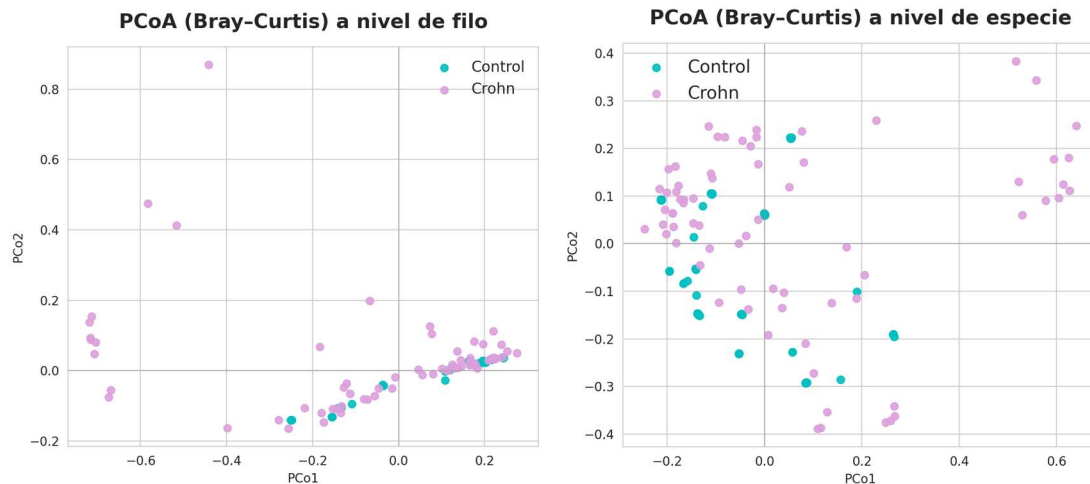


Figura 4. Representación gráfica de la diversidad beta (distancias Bray-Curtis) en las muestras de enfermedad de Crohn (color violeta) y Control (color azul turquesa).

4.2. Análisis del resistoma

4.2.1. Análisis de abundancia de genes

Tras el análisis de las 140 muestras metagenómicas intestinales con Deeparg, se generó una matriz de abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) y una matriz de clases de antibióticos, que luego se normalizaron a logCPM. De los 14,933 genes que Deeparg incluye en su librería (incluyendo tres bases de datos (CARD, ARDB, and UNIPROT) en las muestras se identificaron 445.

El análisis de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) mostró diferencias claras entre pacientes con enfermedad de Crohn y los pacientes controles sanos. En cuanto a la riqueza de ARGs (número de genes diferentes detectados), los pacientes con enfermedad de Crohn presentaron una media significativamente mayor (165 frente a 113 en controles, $p < 0.0001$), indicando una mayor diversidad de genes de resistencia en su microbioma intestinal. De forma similar, la abundancia total de ARGs (número de lecturas asignadas a genes de resistencia) también fue superior en la enfermedad de Crohn (media de 116,984 vs. 84,897 en controles, $p < 0.0001$) (Tabla 3, Figuras 5 y 6).

Variable	Grupo	n	Suma	Mediana	IQR	p valor
Riqueza de ARGs	Crohn	70	11,867.00	166.50	55.75	<0.0001
	Control	70	7,937.00	113.00	18.50	
Abundancia de ARGs	Crohn	70	116,976.75	1,690.19	515.48	<0.0001
	Control	70	84,897.17	1,185.07	162.81	

Tabla 3. Métricas sobre la riqueza de ARGs y abundancia de ARGs en los grupos de pacientes con enfermedad de Crohn y control de pacientes sanos. *p* valor proviene de la comparación entre grupos mediante el test no paramétrico de Mann–Whitney U.

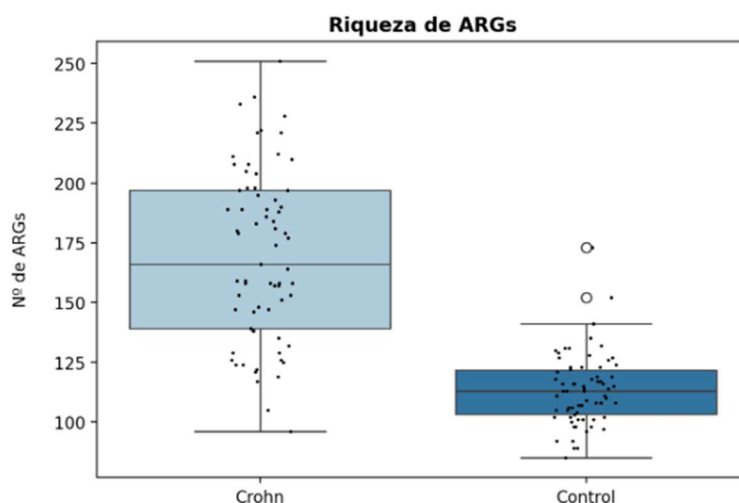


Figura 5. Riqueza de ARGs en los grupos con enfermedad de Crohn (n = 70, mediana = 165.00) y control de pacientes sanos (n = 70, mediana = 113.00).

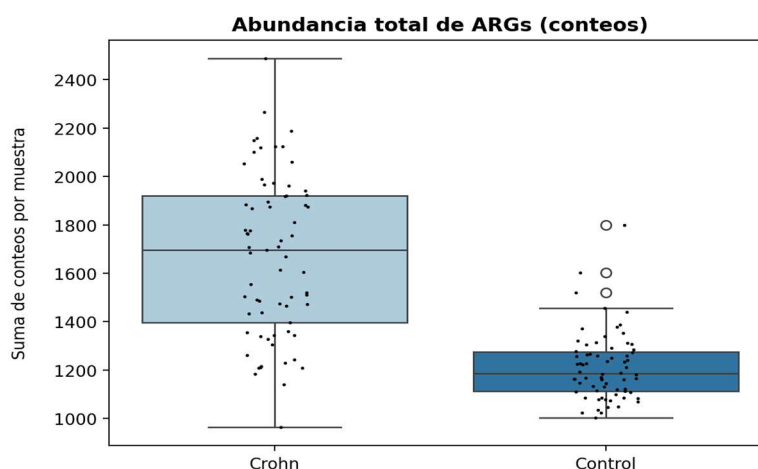


Figura 6. Abundancia de ARGs en los grupos de pacientes con enfermedad de Crohn (n = 70, mediana = 1701.93 y control de pacientes sanos (n = 70, mediana = 1185.07).

Posteriormente, se procedió a identificar los genes con abundancia diferencial significativa entre muestras, obteniéndose un total de 159 genes que han sido significativos estadísticamente. De este conjunto, se seleccionaron los 50 genes más representativos en función de un criterio combinado que consideró la significancia estadística (q-valor), la magnitud de la diferencia de abundancia (*fold change*) y la prevalencia diferencial entre grupos. Esta selección ha permitido la realización de un Heatmap (Figura 7) utilizando las puntuaciones de z (z-scores), con el objetivo de visualizar los patrones de expresión y la agrupación de muestras en torno a estos genes claves.

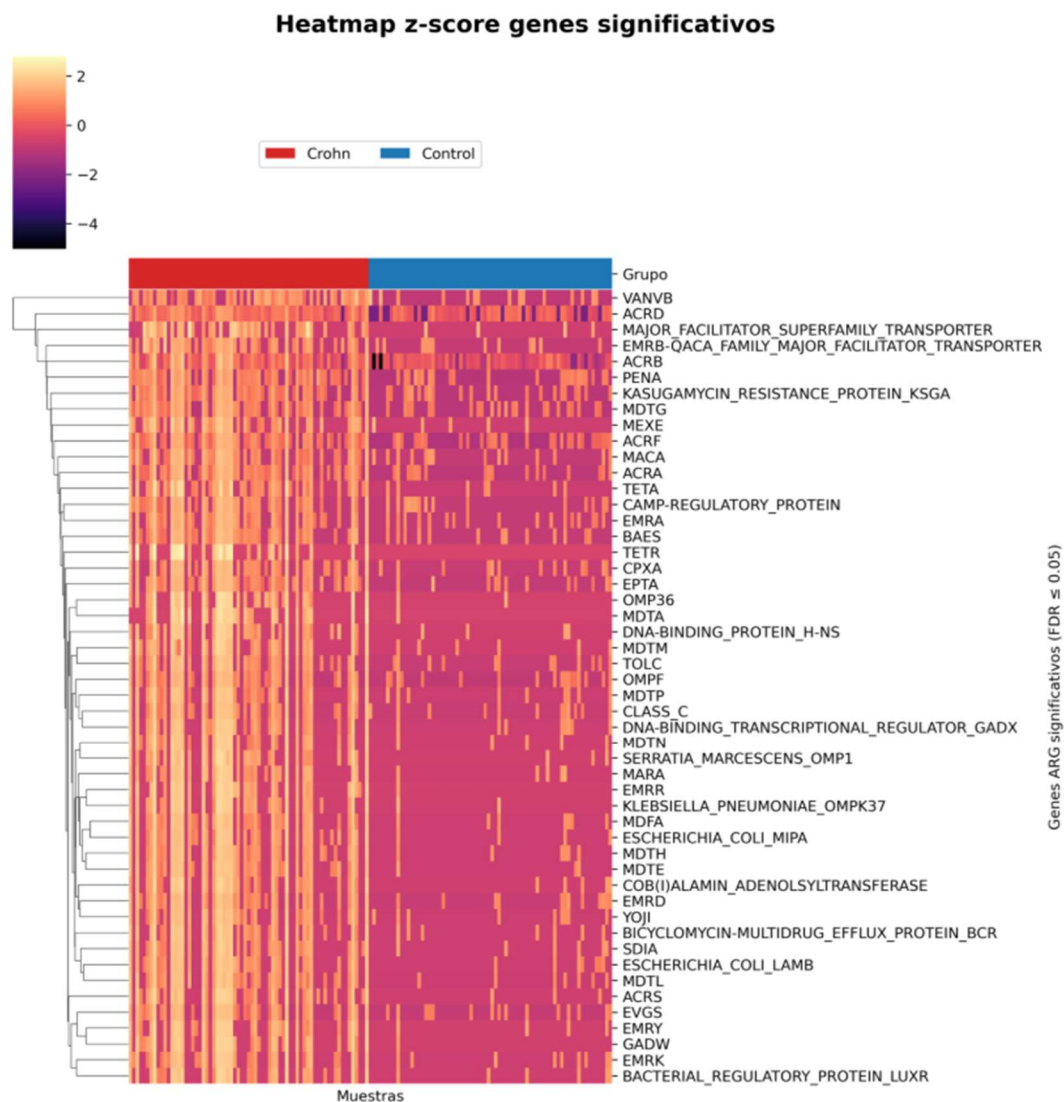


Figura 7. Heatmap de los 50 genes ARG con diferencia más significativa ($q < 0.005$) entre los grupos Crohn (rojo, izquierda) y control (azul, derecha). Cada celda representa el z-score del valor $\log_2(\text{CPM}+1)$ por gen.

Con el fin de priorizar aquellos genes con mayor potencial como biomarcadores, se aplicó un índice compuesto (*score*) que integró la significancia estadística (q-valor), la diferencia de abundancia de medianas y la prevalencia diferencial (Δ presencia). Asignado pesos de 0.1 al q-valor, 0.6 a la diferencia de abundancia y 0.3 a la prevalencia diferencial. Esta ponderación se justificó por la alta significancia estadística general del conjunto, lo que ha permitido dar mayor relevancia a la magnitud del cambio y a la presencia diferencial entre grupos.

Los cinco genes con mayor *score* (mdtE, acrA, eptA, mdtL y mdtH) presentan valores superiores a 0.90, diferencias de abundancia notables (8–9 logCPM) y prevalencias más altas en pacientes con enfermedad de Crohn (tabla 4).

Gen	Score	p-valor	q-valor	Diferencia de abundancia	Δ presencia
mdtE	0.96	9.338e-14	4.17e-11	8.59	0.61
acrA	0.95	7.969e-12	5.77e-10	9.24	0.56
eptA	0.95	6.093e-12	5.44e-10	9.06	0.57
mdtL	0.92	4.844e-12	5.40e-10	8.39	0.56
mdtH	0.91	9.054e-12	5.77e-10	8.35	0.54

Tabla 4. Cinco genes considerados relevantes como posibles biomarcadores de la enfermedad de Crohn según su significancia estadística (q-valor), la diferencia de abundancia de medianas y la prevalencia diferencial.

4.2.1. Análisis de clases de antibióticos

Dada la gran cantidad de genes significativos identificados (159), se decidió continuar el análisis a nivel de clases de antibióticos y evaluando las diferencias a ese nivel. Deeparg, aparte de identificar ARGs, los clasifica según el tipo de antibiótico frente al que confieren resistencia, bajo la variable “predicted_ARG-class”. Nuestros ARGs pertenecieron a 27 clases (Figura 8).

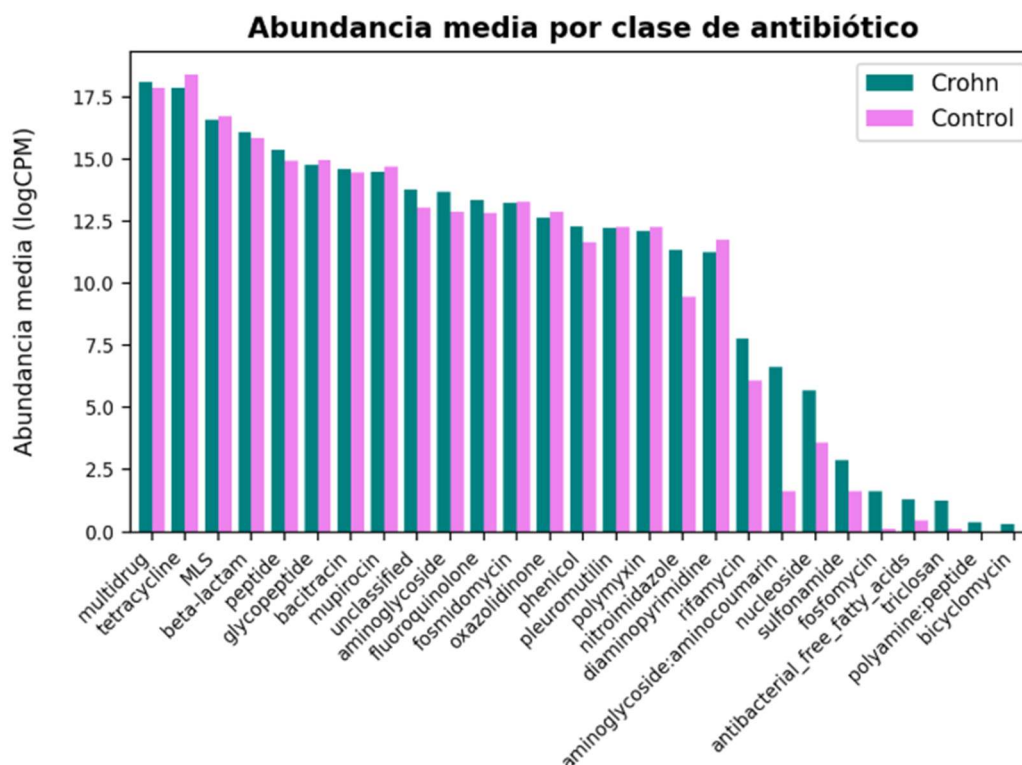


Figura 8. Comparación de la abundancia promedio de las clases de antibióticos entre pacientes con enfermedad de Crohn (color verde) y controles (color violeta).

En el análisis diferencial de estas 27 clases, se calcularon las diferencias de medias, $\log_2$ fold-change ($\log_2FC$) y significancia estadística mediante t-test de Welch, con corrección por comparaciones múltiples usando el método de Benjamini–Hochberg (q-valores). El perfil global de clases de genes de resistencia (ARG) fue similar entre grupos y estuvo dominado por multidroga, tetraciclinas, MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas), beta-lactámicos, péptidos y glicopéptidos. No obstante, el contraste de pacientes con enfermedad de Crohn vs. Control de pacientes sanos ($n=70$ por grupo) sobre abundancias medias identificó 13 clases con diferencias significativas. Entre ellas, seis mostraron además un cambio de magnitud de $\log_2FC$ superior a 1, todas aumentadas en la enfermedad de Crohn: aminoglucósidos/aminocumarinas, rifamicinas, nucleósidos, fosfomicina, nitroimidazoles y triclosán (Tabla 5, Figura 9).

Clase	Media Crohn (logCPM)	Media Control (logCPM)	Log2FC (Crohn- control)	q-valor
aminoglycoside: aminocoumarin	6.85	1.64	5.21	<0.0001
nitroimidazole	11.44	9.45	1.99	<0.0001
fosfomycin	1.56	0.11	1.45	0.0023
triclosan	1.22	0.12	1.10	0.0063
rifamycin	7.76	6.09	1.67	0.0221
nucleoside	5.45	3.61	1.84	0.0229

Tabla 5. Clases de antibioticos significativas (q-valor < 0.005) y log2FC > 1, entre los grupos de pacientes con la enfermedad de Crohn y Control pacientes sanos.

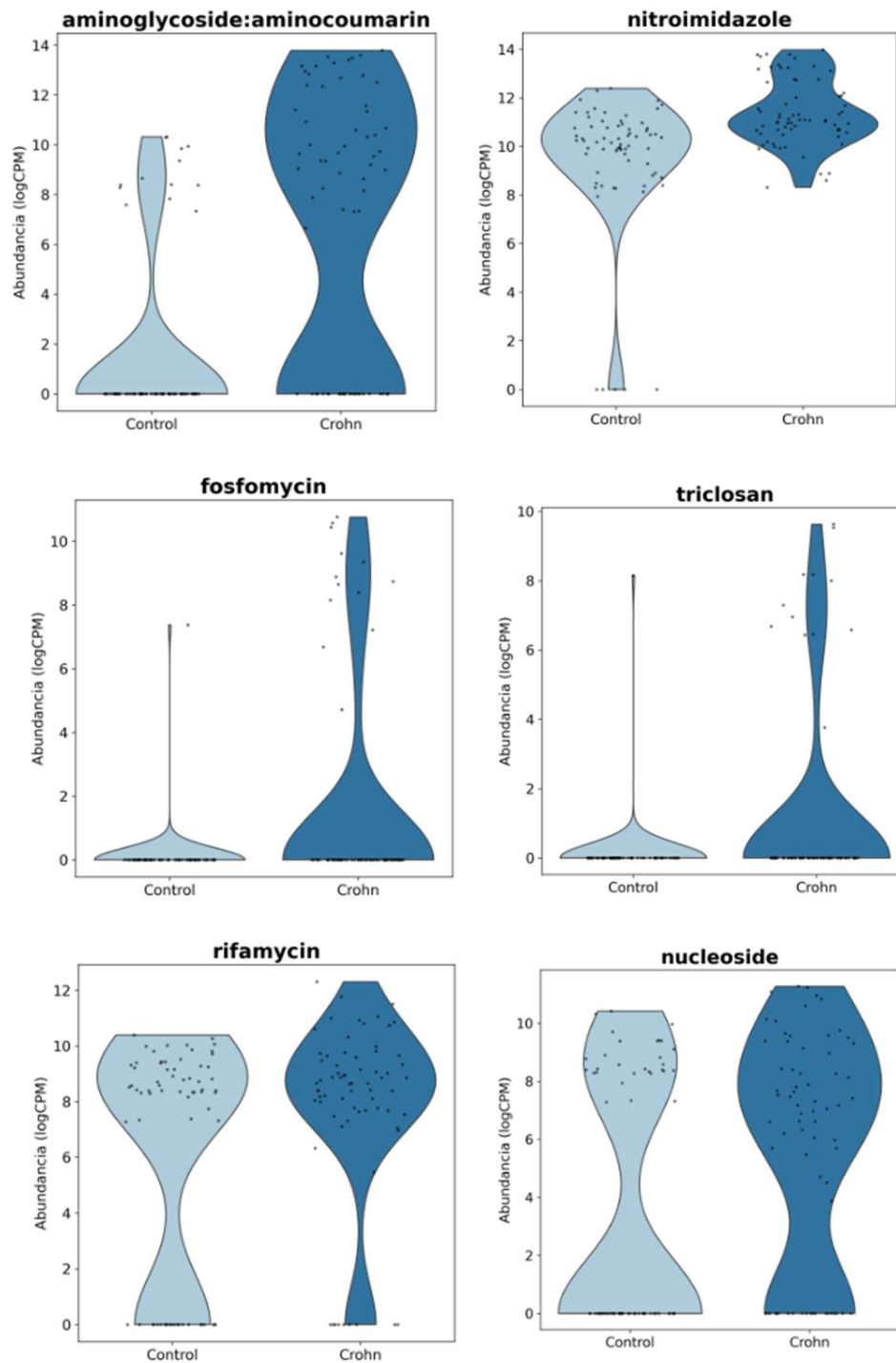


Figura 9. Violin plot de las distribuciones de abundancia de las clases de antibióticos con $q < 0.05$ y $\log_2FC > 1$ de los individuos Control pacientes sanos (azul cian) y Pacientes con enfermedad de Crohn (azul marino).

5. Discusión

El presente estudio aporta evidencia de que la enfermedad de Crohn no solo se asocia con alteraciones descritas en diferentes estudios de la composición taxonómica de la microbiota intestinal, sino también con un resistoma expandido, caracterizado por una mayor abundancia y diversidad de genes de resistencia a antibióticos (Lloyd-Price et al., 2019; Caparrós et al., 2021; Hu et al., 2013).

Alteraciones en la composición microbiana

A nivel taxonómico, los resultados confirman patrones ampliamente descritos en la literatura sobre la enfermedad de Crohn. La reducción de *Bacteroidetes* y el aumento relativo de *Firmicutes*, aunque no alcanzaron significación estadística en el análisis realizado, coinciden con reportes previos que apuntan a un desequilibrio en estos dos grandes filos taxonómicos que constituyen la mayor parte de la microbiota intestinal (Pittayanon et al., 2020).

Se encontró un incremento de Proteobacteria, especialmente *Escherichia coli*, cuya abundancia relativa fue significativamente mayor en los pacientes con enfermedad de Crohn (3.99% vs. 0.04%, $\log_2FC=6.64$). También se observó una disminución de especies consideradas beneficiosas o comensales, como *Alistipes shahii*, *Alistipes finegoldii* y *Odoribacter splanchnicus*. Estos taxones están implicados en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), especialmente butirato, metabolito clave para el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal y la modulación de la respuesta inmune (Louis & Flint, 2017). Esta pérdida de productores de SCFAs se ha descrito en otros estudios (Morgan et al., 2012; Kang et al., 2023) y es una marca característica de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) que podría contribuir a una inflamación, permeabilidad intestinal y disbiosis.

Otro hallazgo relevante fue la mayor heterogeneidad interindividual de la microbiota en los pacientes con enfermedad de Crohn, observada tanto en la diversidad alfa como en la beta. Aunque las diferencias en el índice de Shannon (diversidad alfa) y en la dispersión de Bray-Curtis (diversidad beta), evaluadas a nivel de filo taxonómico y de especies, no alcanzaron significación estadística, se evidenció una mayor dispersión de valores en los pacientes con enfermedades de Crohn en comparación con los controles sanos. En concordancia con estos resultados, la revisión sistemática de Pittayanon et

al. (2019) reportó discrepancias entre estudios respecto a la diversidad: de los nueve que evaluaron la diversidad alfa, cinco encontraron diferencias significativas y cuatro no, lo que refleja la complejidad y variabilidad de los hallazgos en este campo. Los autores atribuyeron estos resultados dispares a variaciones en la selección de pacientes, el tamaño de los estudios y los métodos.

Expansión del resistoma en pacientes con enfermedad de Crohn a nivel de ARGs

Más allá de la disbiosis taxonómica, este trabajo mostró diferencias claras entre pacientes con enfermedad de Crohn y los controles sanos. En cuanto a la riqueza de ARGs (número de genes diferentes detectados), los pacientes con enfermedad de Crohn presentaron una media significativamente mayor (165 frente a 113 en controles), indicando una mayor diversidad de genes de resistencia en su microbioma intestinal. De forma similar, la abundancia total de ARGs (número de lecturas asignadas a genes de resistencia) también fue superior en pacientes con enfermedad de Crohn (media de 1,701 vs. 1,185 en controles).

Estos resultados concuerdan con otros estudios (Feng et al., 2018; Fredriksen et al., 2023) y sugieren que la microbiota de los pacientes con enfermedad de Crohn no solo está alterada en su composición, sino que también presenta un mayor potencial de resistencia antimicrobiana. Existen varias posibles explicaciones para este fenómeno. En primer lugar, la mayor exposición a antibióticos en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es un factor reconocido que puede seleccionar y enriquecer genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en la microbiota intestinal (Zhang et al., 2024). En segundo lugar, el sobrecrecimiento de bacterias del filo taxonómico Proteobacteria, especialmente *E. coli*, actúa como un reservorio natural de resistencia, ya que estos taxones suelen portar plásmidos y elementos genéticos móviles asociados a ARGs (Singh et al., 2019). Finalmente, y como señala el estudio de Bhattarai et al. (2024) donde analizan microbiomas durante el tratamiento de tuberculosis multirresistente, la pérdida de bacterias comensales que compiten ecológicamente con patógenos puede favorecer la expansión de cepas resistentes y a su vez incrementar la abundancia y riqueza de ARGs.

Los cinco genes seleccionados para el análisis (*mdtE*, *acrA*, *eptA*, *mdtL* y *mdtH*) codifican principalmente bombas de eflujo y mecanismos de modificación enzimática, estrategias comunes de resistencia que confieren un fenotipo multidroga (Alcock et al., 2023).

El enriquecimiento de *mdtE* (ARO:3000795, CARD), *mdtH* (ARO:3001216) y *acrA* (ARO:3000207, CARD), componentes de sistemas de eflujo tipo RND (*Resistance-Not-Division*), refleja la presencia de cepas con una capacidad aumentada para expulsar antibióticos de múltiples clases. Esta observación es coherente con la sobrerrepresentación de *E. coli*, ya que estos sistemas han sido ampliamente caracterizados en esta especie y se han vinculado a resistencia multidroga (Zgurskaya & Nikaido, 2000; Chowdhury et al., 2019; Camp et al., 2021).

Por otro lado, la identificación del gen *eptA* (ARO:3003576, CARD), que codifica una fosfoetanolamina-transferasa responsable de modificar el lípido A en enterobacteriáceas, ha sido descrita como un mecanismo importante de resistencia a polimixinas en bacterias Gram-negativas clínicamente relevantes (Huang et al., 2018). Además, se sabe que las enterobacteriáceas pueden adquirir este tipo de resistencia frente a polimixinas, lo que respalda la idea de que el aumento de *eptA* observado en nuestros pacientes con enfermedad de Crohn esté relacionado con contextos de presión antibiótica y disbiosis intestinal (Mmatli et al., 2020).

Finalmente, aunque *mdtL* no cuenta con una entrada en CARD, su similitud con otros genes de la familia *mdt* sugiere que podría codificar otra bomba de eflujo, reforzando la idea de que la resistencia en la enfermedad de Crohn está dominada por mecanismos de eflujo.

Si bien los cinco genes identificados (*mdtE*, *acrA*, *eptA*, *mdtL* y *mdtH*) muestran un potencial considerable como biomarcadores de la enfermedad de Crohn, ser requieren estudios adicionales antes de considerarlos como tal. En primer lugar, sería necesario comparar su abundancia y prevalencia de la enfermedad de Crohn frente a otras IBD (como colitis ulcerosa), con el fin de descartar que se trate de marcadores generales de inflamación intestinal y no exclusivos de la enfermedad de Crohn. Asimismo, convendría evaluar su valor diagnóstico mediante métricas de clasificación (sensibilidad, especificidad, área bajo la curva ROC), y su consistencia en cohortes independientes obtenidas con tecnologías y contextos clínicos distintos. También sería interesante incorporar enfoques multi-ómicos (metatranscriptómica, metaproteómica) para verificar que estos genes no solo están presentes sino también expresados y funcionales en el entorno intestinal. Otro método para seguir estudiando su posible rol como biomarcador sería entrenar modelos de *machine learning* que permitan evaluar la capacidad discriminativa de un conjunto de genes ARG para diferenciar pacientes con enfermedad

de Crohn de controles sanos. Este enfoque han sido aplicados con éxito en otros estudios como el de Schirmer et al. (2018) sobre la dinámica de la metatranscripción en la microbiota intestinal de la IBD, el de Bao et al. (2023) sobre predicción de biomarcadores en la enfermedad de Crohn y en otros recogidos en la revisión sistemática de Huang et al. (2025) sobre el diagnóstico diferencial entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

Análisis a nivel de clase de antibióticos

El estudio de clases de antibióticos reveló que, si bien ambos grupos comparten un núcleo común de resistencias (multidroga, tetraciclinas, MLS y β -lactámicos), los pacientes con la enfermedad de Crohn exhibieron un enriquecimiento específico en varias clases poco frecuentes en los controles. Destacaron los genes contra aminoglucósidos/aminocumarinas, rifamicinas, nucleósidos, fosfomicina, nitroimidazoles y triclosán, todos con incrementos superiores a $\log_2FC > 1$.

En primer lugar, el aumento de genes contra aminoglucósidos/aminocumarinas es coherente con el uso frecuente de aminoglucósidos (como gentamicina o streptomycin) en infecciones oportunistas asociadas a IBD (Shayista et al., 2024; Zhang et al., 2024). Aunque no forman parte de la terapia de la enfermedad de Crohn, su uso repetido puede haber ejercido presión selectiva.

Los genes de resistencia a rifamicinas también mostraron un incremento significativo. La rifaximina, un derivado de la rifamicina, se emplea en algunos casos de IBD por sus efectos locales antiinflamatorios y antimicrobianos (Kothary et al., 2013).

La mayor abundancia de genes contra fosfomicina y nucleósidos es interesante porque estos antibióticos no se emplean rutinariamente en la enfermedad de Crohn, pero sí en el manejo de infecciones urinarias o sistémicas en pacientes hospitalizados (Mattioni-Marchetti et al., 2023). Esto sugiere que el resistoma de la enfermedad de Crohn en un contexto de microbiota inestable podría actuar como reservorio secundario de resistencia.

Respecto a los nitroimidazoles, el hallazgo tiene una conexión clínica directa. El metronidazol, un representante de esta clase, es uno de los antibióticos más utilizados en la enfermedad de Crohn, sobre todo en casos de enfermedad perianal o abscesos (Scribano & Prantera, 2013). La selección repetida de genes resistentes a nitroimidazoles en

la enfermedad de Crohn refuerza la hipótesis de que el uso prolongado de metronidazol favorece la expansión del resistoma y contribuye a la pérdida de eficacia terapéutica. Por último, la resistencia a triclosán refleja un fenómeno de presión ambiental y clínica. El triclosán es un biocida presente en productos de higiene y se ha vinculado con la selección de transportadores de eflujo (Carey & McNamara, 2015).

En conjunto, las diferencias entre clases de antibióticos sugieren que el resistoma en la enfermedad de Crohn no solo presenta una mayor abundancia, sino también una diversidad y complejidad funcional más altas. Esto refleja tanto la influencia del uso médico de antimicrobianos (como metronidazol, rifaximina y aminoglucósidos) como la exposición a biocidas del entorno (como el triclosán). De este modo, el resistoma intestinal en la enfermedad de Crohn puede reflejar de manera indirecta los tratamientos recibidos y las presiones antibióticas a las que el paciente ha estado expuesto.

Limitaciones y futuros enfoques

Este estudio presenta varias limitaciones que deben considerarse a la hora de interpretar los resultados. En primer lugar, aunque se homogenizó el tipo de muestra utilizando únicamente heces y todas fueron analizadas con Illumina HiSeq2000, la integración de datos procedentes de diferentes proyectos puede introducir sesgos derivados de variaciones en protocolos de extracción o condiciones de procesamiento, lo que potencialmente afecta la comparabilidad de los perfiles obtenidos.

En segundo lugar, la metagenómica muestra qué genes están presentes, pero no si realmente están activos. Por ello, la presencia de un ARG no necesariamente implica su expresión o función; sería necesario complementarla con meta-transcriptómica y meta-proteómica para validar su transcripción y traducción, así como con metabolómica que confirmen el fenotipo de resistencia.

Otra limitación importante es el diseño transversal del estudio, ya que se trabajó con muestras tomadas en un único momento. Esto impide analizar cómo cambian el resistoma y la microbiota a lo largo del tiempo o en respuesta a tratamientos concretos. Un diseño longitudinal, con muestreos repetidos en los mismos pacientes, permitiría evaluar la dinámica temporal, la estabilidad y la evolución de estos perfiles.

Finalmente, no se controló de forma exhaustiva la historia antibiótica previa de los participantes, lo que podría explicar parte de las diferencias observadas, ya que este factor

es un determinante conocido en la configuración del resistoma intestinal (Forslund et al., 2013). El estudio tampoco contempla otros metadatos como la genética del paciente, dieta, uso de probióticos o estado inflamatorio exacto, que pueden influir en la composición microbiana y en la expansión de ARGs (David et al., 2014; Lloyd-Price et al., 2019).

En análisis futuros se podrían descargar más muestras de varios estudios y con ellas entrenar un modelo de *machine learning* que permita discriminar entre pacientes con enfermedad de Crohn y sanos en función de su resistoma. Y más adelante también se podría incorporar datos metagenómicos de otras enfermedades inflamatorias intestinales para intentar encontrar biomarcadores genéticos que permitan un diagnóstico diferencial.

Hay estudios como el de Yu et al. (2023) que entrenaron un modelo para predecir la ocurrencia de IBD en nuevas cohortes con una precisión de 0.8651; o el de Romagnoni et al. (2019) que usaron datos metagenómicos del *International Inflammatory Bowel Disease genetic consortium* (IIBDGC) para entrenar diferentes modelos incluyendo regresión logística, *gradient boosted trees* y redes neuronales para clasificar pacientes con enfermedad de Crohn.

Ambos estudios emplearon miles de muestras en sus conjuntos de entrenamiento y validación; si bien, debido a limitaciones de tiempo y capacidad informática, este entrenamiento no se ha podido llevar a cabo en este trabajo.

En conjunto, los resultados subrayan la necesidad de integrar métricas taxonómicas y funcionales en la caracterización de la enfermedad de Crohn, tanto para comprender su fisiopatología como para orientar decisiones clínicas. Futuros trabajos deberían validar estos biomarcadores en cohortes independientes y en otras IBD, incorporar metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica para confirmar actividad funcional, considerar diseños longitudinales y metadatos clínicos detallados (historial antibiótico, dieta, inflamación), y explorar modelos predictivos que combinen taxonomía y resistoma.

6. Conclusiones

Este estudio contribuye a la comprensión de la enfermedad de Crohn al aportar evidencia de una disbiosis intestinal marcada y de un resistoma más amplio y diverso. El análisis taxonómico reveló una composición microbiana alterada en pacientes con enfermedad de Crohn, caracterizada por un aumento en la abundancia de *Proteobacteria* y *Fusobacteria*, y una disminución de especies comensales productoras de SCFAs. Este patrón sugiere una microbiota intestinal menos estable y con mayor potencial patobiótico, en línea con estudios previos.

Desde la perspectiva funcional, el resistoma en la enfermedad de Crohn mostró mayor riqueza y abundancia de genes de resistencia a antibióticos. Destacaron incrementos en clases asociadas tanto a prácticas clínicas (nitroimidazoles, rifamicinas, aminoglucósidos) como a presiones ambientales (triclosán). Estos hallazgos refuerzan que el resistoma intestinal actúa como una huella del historial terapéutico y de las presiones selectivas acumuladas. Se identificaron 161 genes de resistencia a antibióticos (ARGs) con abundancia diferencial significativa entre grupos. Mediante un índice compuesto que integró significancia estadística, diferencia de abundancia y prevalencia, se priorizaron cinco genes con alto potencial como biomarcadores: *mdtE*, *eptA*, *acrA*, *Escherichia coli* LAMB y *mdtL*. Estos genes están asociados a mecanismos de resistencia como bombas de eflujo y modificación enzimática.

Los análisis estadísticos permitieron identificar diferencias relevantes en la composición taxonómica, la diversidad microbiana y la abundancia de ARGs entre pacientes con enfermedad de Crohn y controles. Aunque algunas métricas no alcanzaron significación estadística, se observó una mayor heterogeneidad interindividual en los pacientes con enfermedad de Crohn, lo que refuerza la hipótesis de una microbiota más variable y menos estable en esta enfermedad.

7. Bibliografía

Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., Kwong, M., Liang, Z. C., Niu, K. C., Shan, P., Yang, J. Y. J., Gray, K. L., Hoad, G. R., Jia, B., Bhandu, T., Carfrae, L. A., Farha, M. A., French, S., Gordzevich, R., Rachwalski, K., Tu, M. M., Bordeleau, E., Dooley, D., Griffiths, E., Zubyk, H. L., Brown, E. D., Maguire, F., Beiko, R. G., Hsiao, W. W. L., Brinkman, F. S. L., Van Domselaar, G., & McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>

Arango-Argoty, G., Garner, E., Pruden, A., Heath, L. S., Vikesland, P., & Zhang, L. (2018). DeepARG: A deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0401-z>

Araos, R., Battaglia, T., Ugalde, J. A., Rojas-Herrera, M., Blaser, M. J., & D'Agata, E. M. C. (2019, September 27). Fecal microbiome characteristics and the resistome associated with acquisition of multidrug-resistant organisms among elderly subjects. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 2260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02260>

Bao, W., Wang, L., Liu, X., & Li, M. (2023). Predicting diagnostic biomarkers associated with immune infiltration in Crohn's disease based on machine learning and bioinformatics. *European Journal of Medical Research*, 28(1), 255. <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01200-9>

Bhattarai, S. K., Du, M., Zeamer, A. L., Morzfeld, B. M., Kellogg, T. D., Firat, K., Benjamin, A., Bean, J. M., Zimmerman, M., Mardi, G., Vilbrun, S. C., Walsh, K. F., Fitzgerald, D. W., Glickman, M. S., & Bucci, V. (2024). Commensal antimicrobial resistance mediates microbiome resilience to antibiotic disruption. *Science Translational Medicine*, 16(730), eadi9711. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adi9711>

Camp, J., Schuster, S., Vavra, M., Schweigger, T., Rossen, J. W. A., Reuter, S., & Kern, W. V. (2021). Limited multidrug resistance efflux pump overexpression among multidrug-resistant *Escherichia coli* strains of ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(4), Article e01735-20. <https://doi.org/10.1128/aac.01735-20>

Caparrós, E., Wiest, R., Scharl, M., Rogler, G., Gutiérrez Casbas, A., Yilmaz, B., Wawrzyniak, M., & Francés, R. (2021). Dysbiotic microbiota interactions in Crohn's disease. *Gut Microbes*, 13(1), Article 1949096. DOI: [10.1080/19490976.2021.1949096](https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1949096)

Carey, D. E., & McNamara, P. J. (2015). The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 5, Article 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00780>

Chowdhury, N., Suhani, S., Purkaystha, A., Begum, M. K., Raihan, T., Alam, M. J., Islam, K., & Azad, A. K. (2019). Identification of AcrAB-TolC efflux pump genes and detection of mutation in efflux repressor AcrR from omeprazole-responsive multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections. *Microbiology Insights*, 12, 1178636119889629. <https://doi.org/10.1177/1178636119889629>

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>

Doster, E., Lakin, S. M., Dean, C. J., Wolfe, C., Young, J. G., Boucher, C., Belk, K. E., Noyes, N. R., & Morley, P. S. (2020). MEGARes 2.0: A database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D561–D569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1010>

Feng, J., Li, B., Jiang, X., Yang, Y., Wells, G. F., Zhang, T., & Li, X. (2018). Antibiotic resistome in a large-scale healthy human gut microbiota deciphered by metagenomic and network analyses. *Environmental Microbiology*, 20(1), 355–368. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14009>

Forslund, K., Sunagawa, S., Kultima, J. R., Mende, D. R., Arumugam, M., Typas, A., & Bork, P. (2013). Country-specific antibiotic use practices impact the human gut resistome. *Genome Research*, 23(7), 1163-1169. <https://doi.org/10.1101/gr.155465.113>

Franzosa, E. A., Morgan, X. C., Segata, N., Waldron, L., Reyes, J., Earl, A. M., Giannoukos, G., Boylan, M. R., Ciulla, D., Gevers, D., Izard, J., Garrett, W. S., Chan, A. T., & Huttenhower, C. (2014). Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), E2329-E2338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319284111>

Franzosa, E. A., SirotaMadi, A., AvilaPacheco, J., Fornelos, N., Haiser, H. J., Reinker, S., Vatanen, T., Hall, A. B., Mallick, H., McIver, L. J., Sauk, J. S., Wilson, R. G., Stevens, B. W., Scott, J. M., Pierce, K., Deik, A. A., Bullock, K., Imhann, F., Porter, J. A., Zhernakova, A., Fu, J., Weersma, R. K., Wijmenga, C., Clish, C. B., Vlamakis, H., Huttenhower, C., & Xavier, R. J. (2019). Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nature Microbiology*, 4(2), 293–305. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0306-4>

Fredriksen, S., de Warle, S., van Baarlen, P., Boekhorst, J. & Wells, J. M. (2023). Resistome expansion in disease-associated human gut microbiomes. *Microbiome*, 11, Article 166. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01610-1>

Gevers, D., Kugathasan, S., Denson, L. A., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Ren, B., Schwager, E., Knights, D., Song, S. J., Yassour, M., Morgan, X. C., Waldron, L., Taylor, B. C., Huttenhower, C., & Xavier, R. J. (2014). The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.005>

He, Y., Zhou, X., Chen, Z., Deng, X., Gehring, A., Ou, H., Zhang, L., & Shi, X. (2020). PRAP: Pan Resistome analysis pipeline. *BMC Bioinformatics*, 21, Article 20. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3335-y>

Hracs, L., Windsor, J. W., Gorospe, J., Cummings, M., Coward, S., Buie, M. J., Quan, J., Goddard, Q., Caplan, L., Markovinović, A., Williamson, T., Abbey, Y., Abdullah, M., Abreu, M. T., Ahuja, V., Raja Ali, R. A., Altuwaijri, M., Balderramo, D., Banerjee, R., Kaplan, G. G., et al. (2025). Global evolution of inflammatory bowel disease across

epidemiologic stages. Nature, 642(s41586-025-08940-0), 458–466.
<https://doi.org/10.1038/s41586-025-08940-0>

Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., Pan, Y., Li, J., Zhu, L., Wang, X., Meng, Z., Zhao, F., Liu, D., Ma, J., Qin, N., Xiang, C., Xiao, Y., Li, L., Yang, H., Wang, J., Zhu, B., et al. (2013). Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Communications*, 4, Article 2151.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3151>

Huang, J., Zhu, Y., Han, M.-L., Li, M., Song, J., Velkov, T., Li, C., & Li, J. (2018). Comparative analysis of phosphoethanolamine transferases involved in polymyxin resistance across 10 clinically relevant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51(4), 586-593. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.12.016>

Huang, J., Zhu, X., Ma, Y., Zhang, Z., Zhang, J., Hao, Z., Wu, L., Liu, H., Wu, H., & Bao, C. (2025). Machine learning in the differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease: a systematic review. *Translational Gastroenterology and Hepatology*.
<https://dx.doi.org/10.21037/tgh-24-117>

Kang, D.-Y., Park, J.-L., Yeo, M.-K., Kang, S.-B., Kim, J.-M., Kim, J. S., & Kim, S.-Y. (2023). Diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis using the microbiome. *BMC Microbiology*, 23(1), Article 336. doi: [10.1186/s12866-023-03084-5](https://doi.org/10.1186/s12866-023-03084-5)

Kharaghani, A. A., Harzandi, N., Khorsand, B., Rajabnia, M., Afshari Kharaghani, A., & Hour, H. (2023). High prevalence of mucosa-associated extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among Iranian patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22, 86. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00630-x>

Kothary, V., Scherl, E. J., Bosworth, B., Jiang, Z. D., Dupont, H. L., Harel, J., Simpson, K. W., & Dogan, B. (2013). Rifaximin resistance in *Escherichia coli* associated with inflammatory bowel disease correlates with prior rifaximin use, mutations in *rpoB*, and activity of phenyl-arginine- β -naphthylamide-inhibitable efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 811–817. <https://doi.org/10.1128/aac.02163-12>

Lloyd-Price, J., Arze, C., Ananthakrishnan, A. N., Schirmer, M., AvilaPacheco, J., Poon, T. W., Andrews, E., Ajami, N. J., Bonham, K. S., Brislawn, C. J., Casero, D., Courtney, H., Gonzalez, A., Graeber, T. G., Hall, A. B., Lake, K., Landers, C. J., Mallick, H., Plichta, D. R., Prasad, M., Rahnavard, G., Sauk, J., Shungin, D., VázquezBaeza, Y., White, R. A., Braun, J., Denson, L. A., Jansson, J. K., Knight, R., Kugathasan, S., McGovern, D. P. B., Petrosino, J. F., Stappenbeck, T. S., Winter, H. S., Clish, C. B., Franzosa, E. A., Vlamakis, H., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2019). Multiomics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature*, 569(7758), 655–662. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1237-9>

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, 19(1), 29–41. DOI: [10.1111/1462-2920.13589](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589)

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J., & Dore, J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), 205–211. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.073817>

Mattioni-Marchetti, V., Hrabák, J., & Bitar, I. (2023). Fosfomycin resistance mechanisms in Enterobacterales: An increasing threat. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, Article 1178547. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1178547>

Mmatli, M., Mbelle, N. M., Maningi, N. E., & Osei Sekyere, J. (2020). Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in Enterobacteriaceae: A systematic review of current reports. *mSystems*, 5(6), e00783-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.00783-20>

Morgan, X. C., Tickle, T. L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K. L., Ward, D. V., Reyes, J. A., Shah, S. A., LeLeiko, N., Snapper, S. B., Bousvaros, A., Korzenik, J., Sands, B. E., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2012). Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology*, 13(9), R79. Doi: [10.1186/gb-2012-13-9-r79](https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-9-r79)

NIH HMP Working Group; Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C.

C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A. R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M. H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., & Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317-2323. <https://doi.org/10.1101/gr.096651.109>

Pittayanon, R., Lau, J. T., Yuan, Y., Leontiadis, G. I., Tse, F., Surette, M., & Moayyedi, P. (2019). Gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome — A systematic review. *Gastroenterology*, 157(1), 97-108. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.03.049>

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarnier, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D., & Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>

Rannon, E., Shaashua, S., & Burstein, D. (2025). DRAMMA: a multifaceted machine learning approach for novel antimicrobial resistance gene detection in metagenomic data. *Microbiome*, 13, Article 67. <https://doi.org/10.1186/s40168-025-02055-4>

Romagnoni, A., Jégou, S., Van Steen, K., Wainrib, G., Hugot, J.-P., & the International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (IIBDGC). (2019). Comparative performances of machine learning methods for classifying Crohn Disease patients using genome-wide genotyping data. *Scientific Reports*, 9, 10351. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46649-z>

Safarchi, A., Al-Qadami, G., Tran, CD., Conlon, M. (2025). Understanding dysbiosis and resilience in the human gut microbiome: Biomarkers, interventions, and challenges. *PMC*. doi: [10.3389/fmicb.2025.1559521](https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1559521)

Schirmer, M., Franzosa, E. A., Lloyd-Price, J., McIver, L. J., Schwager, R., Poon, T. W., Ananthakrishnan, A. N., Andrews, E., Barron, G., Lake, K., Prasad, M., Sauk, J., Stevens, B., Wilson, R. G., Braun, J., Denson, L. A., Kugathasan, S., McGovern, D. P. B., Vlamakis, H., Xavier, R. J., & Huttenhower, C. (2018). Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nature Microbiology*, 3(3), 337-346. doi: [10.1038/s41564-017-0089-z](https://doi.org/10.1038/s41564-017-0089-z)

Scribano, M. L., & Prantera, C. (2013). Use of antibiotics in the treatment of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 19(5), 648-653. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i5.648>

Shayista, H., Nagendra Prasad, M. N., Niranjana Raj, S., Prasad, A., Lakshmi, S., Ranjini, H. K., Manju, K., Ravikumara, R., Chouhan, R. S., Khohlova, O. Y., Perianova, O. V., & Baker, S. (2024). Complexity of antibiotic resistance and its impact on gut microbiota dynamics. *Engineering Microbiology*, 5(1), 100187. <https://doi.org/10.1016/j.engmic.2024.100187>

Singh, R. K., Verma, N., & Taneja, N. (2019). The human gut resistome: Current concepts & future prospects. *Indian Journal of Medical Research*, 150(4), 345-358. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1979_17

Thänert, R., Sawhney, S. S., Schwartz, D. J., & Dantas, G. (2022). The resistance within: Antibiotic disruption of the gut microbiome and resistome dynamics in infancy. *Cell Host & Microbe*, 30(5), 675-683. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.013>

Wang, Y., Hu, Y., & Gao, G. F. (2020). Combining metagenomics and metatranscriptomics to study human, animal and environmental resistomes. *Medicine in Microecology*, 3, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2020.100014>

Wright, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature reviews microbiology*. 5, 175-186 (2007). <https://www.nature.com/articles/nrmicro1614>

Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20, 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>

Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>

Yilmaz, B., Juillerat, P., Øyås, O., Ramon, C., Damian Bravo, F., Franc, Y., Fournier, N., Michetti, P., Mueller, C., Geuking, M., Pittet, V. E. H., Maillard, M. H., Rogler, G., Swiss IBD Cohort Investigators, Wiest, R., Stelling, J., & Macpherson, A. J. (2019). Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nature Medicine*, 25(2), 323–336. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0308-z>

Yu, S., Zhang, M., Ye, Z., Wang, Y., Wang, X., & Chen, Y.-G. (2023). Development of a 32-gene signature using machine learning for accurate prediction of inflammatory bowel disease. *Cell Regeneration*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13619-022-00143-6>

Zgurskaya, H. I., & Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*, 37(2), 219-225. Doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01926.x

Zhang, X., Deeke, S. A., Ning, Z., Starr, A. E., Butcher, J., Li, J., Mayne, J., Cheng, K., Liao, B., Li, L., Zhou, J., Shao, L., & Mayne, J. (2018). Metaproteomics reveals associations between microbiome and intestinal extracellular vesicle proteins in pediatric inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, 9(1), 2873. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05357-4>

Zhang, Y., Xue, G., Wang, F., Zhang, J., Xu, L., & Yu, C. (2024). The impact of antibiotic exposure on antibiotic resistance gene dynamics in the gut microbiota of inflammatory bowel disease patients. *Frontiers in Microbiology*, 15, Article 1382332. Doi: [10.3389/fmicb.2024.1382332](https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1382332)

8. ANEXOS

8.1. SRR usadas y datos metagenómicos.

ID	SRR	Condicion	Sexo
1	SRR5950776	Crohn	M
2	SRR5950548	Crohn	M
3	SRR5950625	Crohn	M
4	SRR5935927	Crohn	M
5	SRR5936128	Crohn	M
6	SRR5950760	Crohn	M
7	SRR5946908	Crohn	M
8	SRR5946662	Crohn	M
9	SRR5950556	Crohn	M
10	SRR5950604	Crohn	M
11	SRR5946615	Crohn	M
12	SRR5946629	Crohn	M
13	SRR5935894	Crohn	M
14	SRR5946826	Crohn	M
15	SRR5936186	Crohn	M
16	SRR5946935	Crohn	M
17	SRR5950516	Crohn	M
18	SRR5950734	Crohn	M
19	SRR5947023	Crohn	M
20	SRR5950595	Crohn	M
21	SRR5950672	Crohn	M
22	SRR5946606	Crohn	M
23	SRR5950564	Crohn	M
24	SRR5946833	Crohn	M
25	SRR5950688	Crohn	M
26	SRR5946944	Crohn	M
27	SRR5935903	Crohn	M
28	SRR5946801	Crohn	M
29	SRR5946853	Crohn	M
30	SRR5946883	Crohn	M
31	SRR5950721	Crohn	M
32	SRR5950493	Crohn	M
33	SRR5950691	Crohn	M
34	SRR5950655	Crohn	M
35	SRR5935913	Crohn	M
36	SRR5935746	Crohn	F
37	SRR5935780	Crohn	F

38	SRR5935790	Crohn	F
39	SRR5935804	Crohn	F
40	SRR5935811	Crohn	F
41	SRR5935992	Crohn	F
42	SRR5935967	Crohn	F
43	SRR5935832	Crohn	F
44	SRR5950778	Crohn	F
45	SRR5950698	Crohn	F
46	SRR5950782	Crohn	F
47	SRR5946607	Crohn	F
48	SRR5936119	Crohn	F
49	SRR5950763	Crohn	F
50	SRR5936087	Crohn	F
51	SRR5935754	Crohn	F
52	SRR5946942	Crohn	F
53	SRR5946666	Crohn	F
54	SRR5947050	Crohn	F
55	SRR5947014	Crohn	F
56	SRR5950722	Crohn	F
57	SRR5936018	Crohn	F
58	SRR5936179	Crohn	F
59	SRR5950653	Crohn	F
60	SRR5936075	Crohn	F
61	SRR5935763	Crohn	F
62	SRR5950668	Crohn	F
63	SRR5962903	Crohn	F
64	SRR5935847	Crohn	F
65	SRR5946771	Crohn	F
66	SRR5946948	Crohn	F
67	SRR5950606	Crohn	F
68	SRR5936225	Crohn	F
69	SRR5950610	Crohn	F
70	SRR5936079	Crohn	F
71	SRR540419	Control	M
72	SRR532494	Control	M
73	SRR539740	Control	M
74	SRR539988	Control	M
75	SRR533950	Control	M
76	SRR539725	Control	M
77	SRR528151	Control	M
78	SRR1569267	Control	M
79	SRR1571123	Control	M
80	SRR1569004	Control	M
81	SRR545410	Control	M

82	SRR537726	Control	M
83	SRR549749	Control	M
84	SRR533943	Control	M
85	SRR533837	Control	M
86	SRR549739	Control	M
87	SRR538227	Control	M
88	SRR538214	Control	M
89	SRR528023	Control	M
90	SRR549571	Control	M
91	SRR533542	Control	M
92	SRR528114	Control	M
93	SRR1031348	Control	M
94	SRR528389	Control	M
95	SRR1031582	Control	M
96	SRR528256	Control	M
97	SRR1031852	Control	M
98	SRR549587	Control	M
99	SRR540381	Control	M
100	SRR539748	Control	M
101	SRR533952	Control	M
102	SRR541095	Control	M
103	SRR541114	Control	M
104	SRR527903	Control	M
105	SRR528458	Control	M
106	SRR540954	Control	F
107	SRR532191	Control	F
108	SRR549608	Control	F
109	SRR1565870	Control	F
110	SRR545431	Control	F
111	SRR1565737	Control	F
112	SRR1568978	Control	F
113	SRR1569227	Control	F
114	SRR1571656	Control	F
115	SRR1569272	Control	F
116	SRR541104	Control	F
117	SRR1564364	Control	F
118	SRR1571662	Control	F
119	SRR538157	Control	F
120	SRR1569917	Control	F
121	SRR1031324	Control	F
122	SRR1571614	Control	F
123	SRR1571054	Control	F
124	SRR532765	Control	F
125	SRR1570016	Control	F

126	SRR540942	Control	F
127	SRR533302	Control	F
128	SRR534439	Control	F
129	SRR537723	Control	F
130	SRR541157	Control	F
131	SRR534571	Control	F
132	SRR541192	Control	F
133	SRR549433	Control	F
134	SRR1031621	Control	F
135	SRR541163	Control	F
136	SRR532641	Control	F
137	SRR545662	Control	F
138	SRR532541	Control	F
139	SRR540706	Control	F
140	SRR539595	Control	F